
This is the **published version** of the bachelor thesis:

Ayuste Tornay, Esther; Blasco Sierra, Montse; Martí Nicolovius, Margarita, dir.
Efectos de la D-cicloserina en la neurogénesis hipocampal en ratas envejecidas :
relación con las funciones cognitivas. 2015. 57 pàg. (954 Grau en Psicologia)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/148553>

under the terms of the  license

EFFECTOS DE LA D-CICLOSERINA EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL EN RATAS ENVEJECIDAS: RELACIÓN CON LAS FUNCIONES COGNITIVAS.

RESUMEN

La generación de nuevas células (neurogénesis) se produce a lo largo de toda la vida adulta en regiones concretas como el giro dentado (GD) del hipocampo. Durante el envejecimiento se produce una progresiva reducción de la tasa y velocidad neurogénica, que se ve modulada por diversos factores como la restricción calórica, el ejercicio físico y, como las últimas investigaciones indican, con fármacos como la D-cicloserina (DCS).

Nuestro trabajo pretende comprobar si la DCS inyectada en el hipocampo contribuye a modular el declive de la neurogénesis que se produce en el GD durante el envejecimiento. Con este objetivo se analizó la supervivencia celular del GD de un total de 12 ratas jóvenes (3-4 meses) y 10 ratas viejas (24-26 meses) sometidas a pruebas de aprendizaje como el laberinto acuático de Morris (LAM) y la transmisión social de preferencias (TSPA). Los resultados mostraron una reducción significativa en el número de nuevas células en ratas envejecidas pero no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y experimental al que se le administró la DCS. Estos resultados parecen indicar que la DCS no detiene la disminución de la supervivencia celular en el GD, ya que las diferencias entre los animales sometidos al tratamiento y aquellos que no han recibido ninguno, se mantienen con la edad.

Palabras clave: neurogénesis, hipocampo, giro dentado, D-cicloserina, supervivencia celular, envejecimiento, aprendizaje hipocampo-dependiente.

ABSTRACT

Generation of new cells (neurogenesis) occurs throughout adulthood in specific regions such as the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. A progressive reduction in the rate and neurogenic speed occurs during aging, which is modulated by factors such as caloric restriction, exercise and, as recent publications suggests, drugs such as D-cycloserine (DCS). Our aim was to investigate whether DCS injected into the hippocampus contributes to modulate the decline of neurogenesis that occurs in the DG during aging.

Our research we analyzed cellular survival rates in a total of 24 rats: 12 young rats (3-4 months) and 10 old rats (24-26 months) tested for behavioral performance in the Morris Water Maze (LAM) and the Social Transmission of Food Preferences (STFP). Results showed a significant reduction in new cells in old rats but no significant differences in between experimental rats administrated with DCS control groups. These results suggest DCS does not stop decrease of cell survival in GD, since differences between experimental subjects and those who have not received any treatment were similar throughout age.

Keywords: neurogenesis, hippocampus, dentate gyrus, D-cycloserine, cell survival, hippocampus-dependent learning.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el incremento de la esperanza de vida ha dado lugar a un aumento en el número de personas que padece deterioro cognitivo, ya que el envejecimiento cerebral supone un factor de riesgo de padecer demencias y se estima que un 50% de los adultos con más de 85 años padece Alzheimer (Bishop & Yankner, 2010). El aumento de las enfermedades que se acompañan con deterioro de la memoria ha motivado a los investigadores a estudiar los mecanismos biológicos involucrados en el envejecimiento cerebral y su relación con la pérdida de funciones cognitivas. Parte de esta investigación se ha centrado en el estudio de la producción de nuevas neuronas o neurogénesis cerebral necesaria para fomentar y mantener la plasticidad sináptica, mecanismo neural relacionado con los procesos de aprendizaje y memoria (Cameron & Glover, 2015).

Se ha observado que con la edad y de forma natural, se produce una reducción de la neurogénesis en el hipocampo (HPC), estructura necesaria en los procesos de memoria (Jurd, 2011). Asimismo, en los últimos años también ha adquirido una especial relevancia el estudio de tratamientos que funcionarían como factores protectores del declive cognitivo y que podrían reducir las consecuencias del envejecimiento cerebral. En este sentido, investigaciones recientes han demostrado que la D-cicloserina (DCS), un agonista parcial del lugar de unión de la glicina del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), puede potenciar la plasticidad sináptica y la neurogénesis hipocampal (Ren, Li,

Zhang, Wang, & Ma, 2013) y en consecuencia disminuir los efectos del deterioro cognitivo que acompaña al envejecimiento normal o patológico.

El estudio que presentamos tiene como objetivo principal determinar si la DCS como potenciador cognitivo es capaz de reducir la disminución de la neurogénesis hipocampal que se produce de forma natural durante el envejecimiento. Los apartados que siguen a continuación justifican la realización de nuestro trabajo en base a la información extraída de diversos artículos y publicaciones sobre el envejecimiento cognitivo, la neurogénesis hipocampal y la DCS. A continuación se presentan los antecedentes experimentales y la hipótesis de partida así como los objetivos planteados. También presentamos una breve explicación del procedimiento experimental que se llevará a cabo, teniendo en cuenta el cronograma al que nos ajustaremos.

1.1. Envejecimiento cerebral y deterioro cognitivo

El envejecimiento cerebral está presente en todas las especies de mamíferos y se define como un proceso fisiológico que produce pérdida de la capacidad de adaptación a cualquier cambio del entorno, necesaria para una vida de relación con los demás satisfactoria (Izquierdo, 2001). Los estudios sobre el cerebro envejecido han observado cambios a nivel del sistema nervioso central (SNC) como la disminución del peso y volumen cerebrales, atrofia

cortical, pérdida de neuronas corticales y de algunos núcleos subcorticales así como de una disminución de los circuitos neurales y de la plasticidad sináptica (Bishop & Yankner, 2010; Izquierdo, 2001; Yankner, Lu & Loerch, 2008). Estos cambios conllevan un

deterioro de las funciones cognitivas, especialmente a la memoria, debido a la afectación

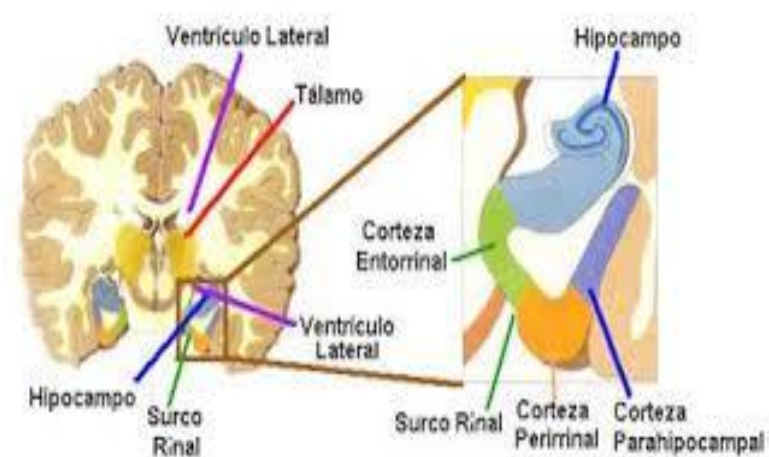


Figura 1: La imagen de la izquierda muestra donde se encuentra ubicado el HPC en el lóbulo temporal medial. La imagen de la derecha muestra una ampliación del HPC.

de estructuras del lóbulo temporal medial como el HPC (Samson & Barnes, 2013) (Figura 1).

También se produce una disminución de la sustancia blanca, especialmente en el córtex prefrontal y el cuerpo calloso anterior, estructuras relacionadas con la memoria a corto plazo, la velocidad de procesamiento y la memoria de trabajo (Yankner, Lu & Loerch, 2008). Con todo, se han hallado evidencias que demuestran que durante el envejecimiento no se produce una pérdida significativa de neuronas como se creía hasta el momento, sino una disminución de los contactos sinápticos (Bishop & Yankner, 2010; Yankner, Lu & Loerch, 2008). Asimismo, se han observado alteraciones en los niveles de calcio que afectan a la comunicación sináptica en el HPC envejecido y disfunción mitocondrial derivada de las alteraciones en la expresión génica como resultado del estrés oxidativo y las mutaciones del DNA reparador (Bishop & Yankner, 2010). La reducción de la función mitocondrial se ha asociado a una esperanza de vida menor y a la aparición de enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Estudios recientes con ratones knock-out sometidos a mutaciones del ADN mitocondrial han mostrado evidencias de aceleración del proceso de envejecimiento (Yankner, Lu & Loerch, 2008).

1.2. Neurogénesis en el HPC durante el envejecimiento

La neurogénesis es el proceso de proliferación y desarrollo de nuevas neuronas y células gliales en el SNC. Durante el desarrollo cerebral del feto las células madre proliferan y se diferencian en los diferentes tipos de células y en el caso de las neuronas se crean nuevas conexiones sinápticas y nuevos circuitos cerebrales. Aunque este proceso es muy activo durante el desarrollo del cerebro, en la etapa adulta se produce un marcado descenso (Cameron & Glover, 2015). En los últimos años se ha investigado este proceso en cerebros envejecidos y se ha observado que la neurogénesis continúa de manera localizada cuando el animal es adulto en regiones como la zona subventricular, concretamente en el bulbo olfatorio, y la zona subgranular del giro dentado (GD) del HPC pero en menor cuantía (Drew, Fusi & Hen, 2013; Lee, Clemenson & Gage, 2012). La estimulación de las neuronas de esta área induce potenciación a largo plazo (PLP), fenómeno que consiste en un aumento a largo plazo de la excitabilidad de una neurona ante determinados impulsos sinápticos debido a una actividad recurrente y de alta frecuencia en las aferencias del giro dentado provenientes de la corteza entorrinal. El haz

de axones que permite esta conexión es la vía perforante. Este tipo de potenciación es un factor esencial en el aprendizaje y la memoria (Nabavi, Proloux, Lin, Tsien & Malinow, 2014).

La neurogénesis es un proceso clave en la plasticidad cerebral. Los estudios con animales muestran que las nuevas células desarrolladas en el GD durante la adultez se integran en circuitos hipocampales y permiten reforzar las conexiones sinápticas. El hecho de que el HPC se relacione con los procesos mnemónicos, sugiere que la generación de nuevas neuronas en animales adultos y envejecidos podría ser clave para el mantenimiento óptimo de los procesos de aprendizaje y memoria. Sin embargo, durante el envejecimiento se ha observado un descenso del proceso de neurogénesis que se ha relacionado con el deterioro cognitivo. A su vez, se ha indicado que una disminución de la neurogénesis afecta a los procesos de aprendizaje y memoria dependientes del HPC (Bolognin, Buffeli, Puoliväli & Iqbal, 2014). Por otro lado, se han hecho estudios en animales criados en ambientes enriquecidos para demostrar que un entorno de este tipo facilita el aprendizaje de tareas espaciales, que correlaciona positivamente con el nivel de neurogénesis (Speisman et al., 2013).

La causa del descenso de la neurogénesis durante el envejecimiento no está clara aunque se han sugerido diversas hipótesis. Una de ellas es la disminución del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), necesario para estimular la supervivencia y desarrollo de las neuronas uniéndose a sus receptores (Bolognin, Buffeli, Puoliväli & Iqbal, 2014). Otra hipótesis sería la supresión de la autorrenovación de células madre. En ese sentido, se ha identificado un factor de transcripción de las células madre llamado SOX2 o SRY-box 2 (Sex determining Region Y-box 2) que actúa como un marcador de éstas. Aunque no se ha visto una disminución de estas células en ratas envejecidas, sí que se aprecia una disminución de la proliferación. Estos datos sugieren que la reducción de la neurogénesis puede deberse a que las células madre entran en estado de reposo (Lee, Clemenson & Gage, 2012).

1.3. Efectos de la D-cicloserina en la potenciación cognitiva de ratas envejecidas

La DCS es una sustancia antibiótica utilizada principalmente contra la bacteria de la tuberculosis. Es un agonista parcial de los receptores NMDA del glutamato ya que funciona uniéndose a estos en el lugar de la glicina facilitando su activación. El glutamato es el neurotransmisor excitador más relevante del cerebro. Los receptores NMDA son receptores ionotrópicos ya que controlan canales iónicos de calcio normalmente bloqueados por iones de magnesio. El magnesio impide la entrada de los iones de calcio hasta que el receptor entra en contacto con el neurotransmisor y, a su vez, la membrana post-sináptica está despolarizada. Esto provoca la expulsión del magnesio dejando paso al calcio. La despolarización de la membrana sucede gracias a la estimulación del receptor ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), que permite la entrada de sodio. El calcio actúa como segundo mensajero que permitirá la creación de nuevas dendritas y receptores y por lo tanto de nuevas conexiones. Este proceso está directamente relacionado con la PLP y en consecuencia con el aprendizaje y la memoria (Nabavi, Proloux, Lin, Tsien & Malinow, 2014).

Conociendo estos datos, se han realizado diversos estudios sobre la influencia de la DCS en el aprendizaje de la extinción del miedo en humanos y se ha utilizado como procedimiento complementario para el tratamiento de trastornos de ansiedad como fobias sociales o el trastorno obsesivo compulsivo (TOC) (Hofmann, Meuret, Smits, Simon, Pollack & Eisenmenger 2006; Ressler, Rothbaum, Tannenbaum, Anderson, Graap & Zimand, 2004). Además, encontramos evidencias que demuestran que la DCS facilita el aprendizaje espacial dependiente del HPC en ratas envejecidas. En un estudio en el que se examinaba los efectos conductuales de administrar dicha sustancia a un grupo de ratas viejas (24 meses de edad) y a un grupo de ratas jóvenes (4 meses de edad), se observó que aquellas ratas a las que se les suministraba DCS mostraban un mejor rendimiento en el Laberinto Acuático de Morris, en comparación con el grupo control (Baxter, Lanthorn, Frick, Golski, Wan & Olton, 1994).

Estos resultados han sido confirmados por trabajos posteriores en los que se observó que la DCS mejoraba la adquisición de una tarea de navegación en ratas adultas (Aura, Riekkinen & Riekkinen, 1998; Aura & Riekkinen, 2000). Por otro lado, estudios relacionados con la extinción del miedo demuestran que la infusión de DCS en el HPC

provoca un aumento significativo de la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA en el giro dentado, CA1 y CA3, del HPC. Asimismo, se ha comprobado que la DCS produce un aumento el número de nuevas células en fase de proliferación en el HPC, concretamente en la zona subgranular y en el hilus (Ren, Li, Zhang, Wang & Ma, 2013).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a los antecedentes expuestos, este trabajo tiene como objetivo estudiar los posibles efectos beneficiosos de la DCS inyectada en el HPC en la neurogénesis del GD de ratas envejecidas y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria. Es por ello, que la hipótesis de partida es la siguiente: la potenciación de la transmisión glutamatérgica en el HPC mediante la estimulación de los receptores NMDA mejora las funciones cognitivas durante el envejecimiento potenciando la neurogénesis en edades avanzadas.

Por lo tanto, los objetivos específicos son los siguientes:

1. Confirmar que la neurogénesis en el GD de las ratas viejas es menor que la de las ratas jóvenes.
2. Estudiar si la DCS inyectada en el HPC de ratas envejecidas promueve la supervivencia de nuevas células en comparación con las ratas no tratadas.

3. MÉTODO

3.1. Sujetos experimentales y obtención de muestras

La muestra estaba formada por un total de 22 ratas de la cepa *Rattus norvegicus*, divididas en dos grupos según su edad: 12 ratas jóvenes (3-4 meses de edad) y 10 ratas viejas (22-24 meses de edad). Dentro de cada grupo de edad encontramos ratas a las que se les inyectó DCS (grupo experimental) o PBS (grupo control) en el HPC. Las ratas fueron criadas en el Laboratorio de Psicobiología de la Universidad Autónoma de Barcelona, en condiciones de temperatura y humedad constantes, así como un ritmo circadiano de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se mantuvieron en jaulas compartidas (2-3 individuos por grupo) con espacio suficiente para desplazarse, evitando así el estrés debido al aislamiento social. La administración de Bromodesoxiuridina (BrdU) se realizó en la semana de descanso entre las dos tareas de aprendizaje la transmisión social de preferencias alimentarias (TSPA) y el laberinto acuático de Morris (LAM) (ve apartado 3.2.). La dosis administrada varió en función del peso de la rata (100 mg/KG), durante cinco días consecutivos. Durante el procedimiento conductual a la mitad de las ratas, tanto jóvenes como viejas, se les administró 10 µg de DCS y a la otra mitad sustancia vehículo tampón fosfato salino (PBS). Ambas sustancias fueron inyectadas en el HPC ventral (HPCv) 20 minutos antes del entrenamiento en la tarea de la TSPA y de cada una de las 5 sesiones de aprendizaje en el LAM. Las pruebas de retención se realizaron 72 horas después y no se administró ninguna de las dos sustancias.

Las 22 ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidas intracardiamente con Paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en PBS. Los cerebros de las ratas fueron extraídos y sumergidos en una solución de PFA al 4% a -4°C durante 3 horas. Posteriormente, fueron congelados (-80°C) para su conservación y tratamiento. Se realizó el seccionamiento del HPC, obteniendo secciones coronales de 40µm y se conservó en una solución crioprotectora a -20°C.

3.2. Inmunohistoquímica para la BrdU

La inmunohistoquímica para la BrdU es un procedimiento que permite estudiar la proliferación, maduración y supervivencia de las nuevas células gliales y neuronas del HPC. Se utiliza el antígeno bromodesoxiuridina o BrdU, un nucleótido sintético análogo de la timina, inyectado antes del sacrificio de las ratas. La BrdU es un análogo a la timina (una de las bases del DNA) o que le permite incorporarse a éste cuando se produce la mitosis actuando, por lo tanto, como un marcador de nuevas células en proliferación durante el periodo en que se administra la sustancia. Dado que el sacrificio de los animales se realizó 21 días después de la primera inyección este proceso nos permite comprobar si ha habido supervivencia celular. En el caso de que se hubieran sacrificado en un periodo de 24-48h se evaluaría proliferación celular. El proceso que se detalla a continuación, tiene por objetivo hacer visibles en el microscopio todas las células del GD mediante DAPI (marcador fluorescente) así como las nuevas células marcadas con BrdU mediante la unión de un anticuerpo primario y uno secundario fluorescente.

La inmunohistoquímica se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

1. Las muestras se colocan en 2 placas de 12 pocillos cada una.
2. Se realizan 3 lavados en PBS1X de 20 minutos. El PBS1x es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio de pH neutro



Figura 2: lavado de los 24 pocillos con PBS1x a 80rpm después de añadir el anticuerpo secundario.

- (pH 7.2-7.4) y es utilizado para lavar células (Figura 2).
3. Seguidamente se desnaturaliza el DNA con ácido clorhídrico, diluido y precalentado a 37°, durante 1 hora en el horno.
4. Se realizan 3 lavados de Tampón Borato para neutralizar la acidez.

5. Posteriormente, se hacen 3 lavados con PBS1X durante 7 minutos.
6. Se hace un lavado con tampón fosfato salino con tritón (PBS-T) de 7 minutos. El PBS-T es una solución detergente que permeabiliza la membrana celular, permitiendo que los anticuerpos utilizados posteriormente puedan entrar dentro de la célula.
7. Se realiza el bloqueo de las uniones específicas con un tampón bloqueo, compuesto por sérum fetal bovino (SFB) y PBS-T. Se hace un lavado de 20 minutos.
8. Incubación del anticuerpo primario: Rat antiBrdU Abcam ab6326 (Ab1 BrdU). Se deja incubar toda la noche a 4°C.
9. Al día siguiente, se realizan 3 lavados con PBS-T durante 7 minutos cada uno. Seguidamente se realiza la incubación del anticuerpo secundario, Goat antirat IgG H&L (Alexa Fluor 488 preadsorber).
10. Después se realiza la incubación de 4'6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI). El DAPI es un marcador fluorescente que puede pasar a través de la membrana y teñir el ADN, células vivas y células fijas. Se une a regiones enriquecidas de Adenina y Timina y permitirá el recuento celular a través del microscopio.
11. Se realizan 2 lavados de PBS1x de 7 minutos y seguidamente 2 lavados de tampón fosfato PBS1X.
12. Una vez terminada la inmunohistoquímica se realiza el montaje de las muestras, utilizando portaobjetos en los cuales se pone la muestra evitando las arrugas y se tapa con el cubre. Las muestras se guardan tapadas en nevera, para evitar así que se pierda la fluorescencia (Figura 3).

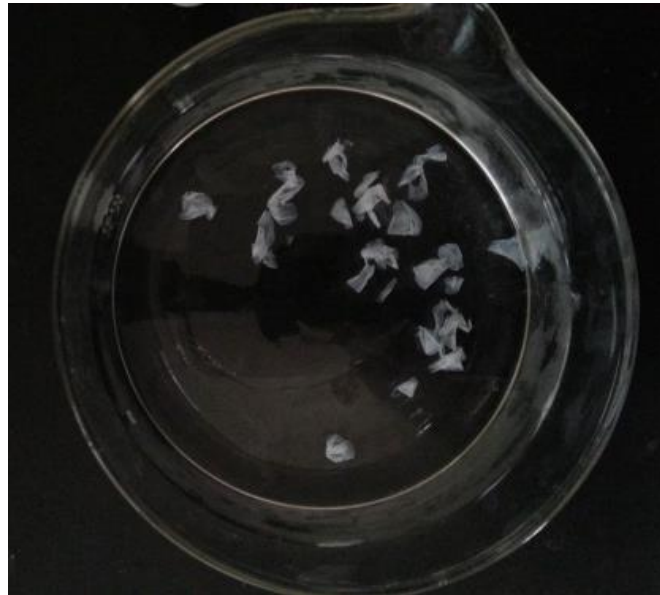


Figura 3: Procedimiento de montaje, las muestras se encuentran en PBS.

3.3. Fotografía y cuantificación al microscopio.

El proceso de fotografía y cuantificación celular del GD se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UAB, mediante el Microscopio Óptico de Epifluorescencia Nikon TE2000e (Figura 4). Para fotografiar las muestras utilizamos el Objetivo Plan Apo 20x/0.45 DIC Ph1 DM y la cámara Hamamatsu ORCA-ER monocromática. El microscopio dispone además de diversos filtros de fluorescencia. En nuestro caso, se utilizaron dos para cada región del GD:



Figura 4: Microscopio Óptico de Epifluorescencia Nikon Eclipse te2000-e en el laboratorio de Bioquímica de la facultad de Medicina UAB.

el filtro UV-2E o canal de DAPI y el filtro B-2EK o canal de BrdU. Estos dos canales permiten detectar las nuevas células generadas desde la primera inyección de BrdU en el animal hasta el momento del sacrificio. El canal de BrdU permite detectar la neurogénesis mediante la fluorescencia mientras el canal DAPI confirma si la señal observada con BrdU coincide con un cuerpo celular del GD. Estos canales permiten afirmar que se trata de una célula nueva y, por lo tanto, que ha habido neurogénesis.

El microscopio Nikon TE2000e permite la programación de fotografía continua en una región de corte, en este caso del GD. Después de establecer las condiciones de fotografía y el rango a fotografiar, el resultado obtenido fue un conjunto de fotografías que variaron en función del tamaño del GD; se obtienen entre 20 y 40 capturas por GD tanto con el canal DAPI como con el canal BrdU.

Para la realización de las fotografías se utilizó el programa MetaMorph que se utiliza para la adquisición y análisis de imágenes microscópicas de forma automatizada. Al visualizar las imágenes del microscopio a través del programa es posible enfocarlas para obtener una mayor nitidez así como ajustar el contraste de los filtros DAPI y BrdU. En el anexo 1 se encuentra la guía de uso del programa realizada para nuestro estudio y que hemos

seguido. Las condiciones de DAPI se ajustaron para cada región hasta obtener una buena visualización. No obstante, una vez establecidas las condiciones del filtro de BrdU estas no fueron modificadas, con el objetivo de conseguir imágenes con los mismos valores de fluorescencia y evitar así posibles sesgos y falsos positivos respecto a los cuerpos celulares. Finalmente se seleccionaron 6 cortes de GD por sujeto para la cuantificación, y se analizaron un total de 132 muestras.

Posteriormente, se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ para unir las fotografías y realizar los montajes de cada GD. Este programa permite la comparación entre las fotografías resultantes con fluorescencia BrdU y aquellas con DAPI creando un mosaico único, fusionando ambos canales. Esto posibilita comprobar la presencia de células nuevas y cuantificarlas según los criterios establecidos en cuanto a forma, tamaño, fluorescencia y localización en el GD (Figura 5). En el anexo 2 se encuentra la guía de uso de ImageJ que hemos creado y utilizado durante el estudio.

Los criterios establecidos para el conteo de nuevas células fueron los siguientes:

1. Se seleccionaron las señales fluorescentes de BrdU que coincidían en forma y tamaño con el cuerpo celular marcado por DAPI dentro del GD.
2. Se descartaron aquellas señales fluorescentes demasiado pequeñas o demasiado grandes para ser consideradas un cuerpo celular pese a encontrarse dentro del GD.
3. Se computaron como nuevas células las marcadas con BrdU que coincidían con un cuerpo celular marcado por DAPI dentro de 30 píxeles de distancia de un punto del GD.
4. Se descartaron las señales de fluorescencia con contornos desiguales por no considerarse la forma propia de un cuerpo celular.
5. No se contabilizaron señales de fluorescencia con intensidad mínima por no ser una señal suficiente para ser considerada una nueva célula.

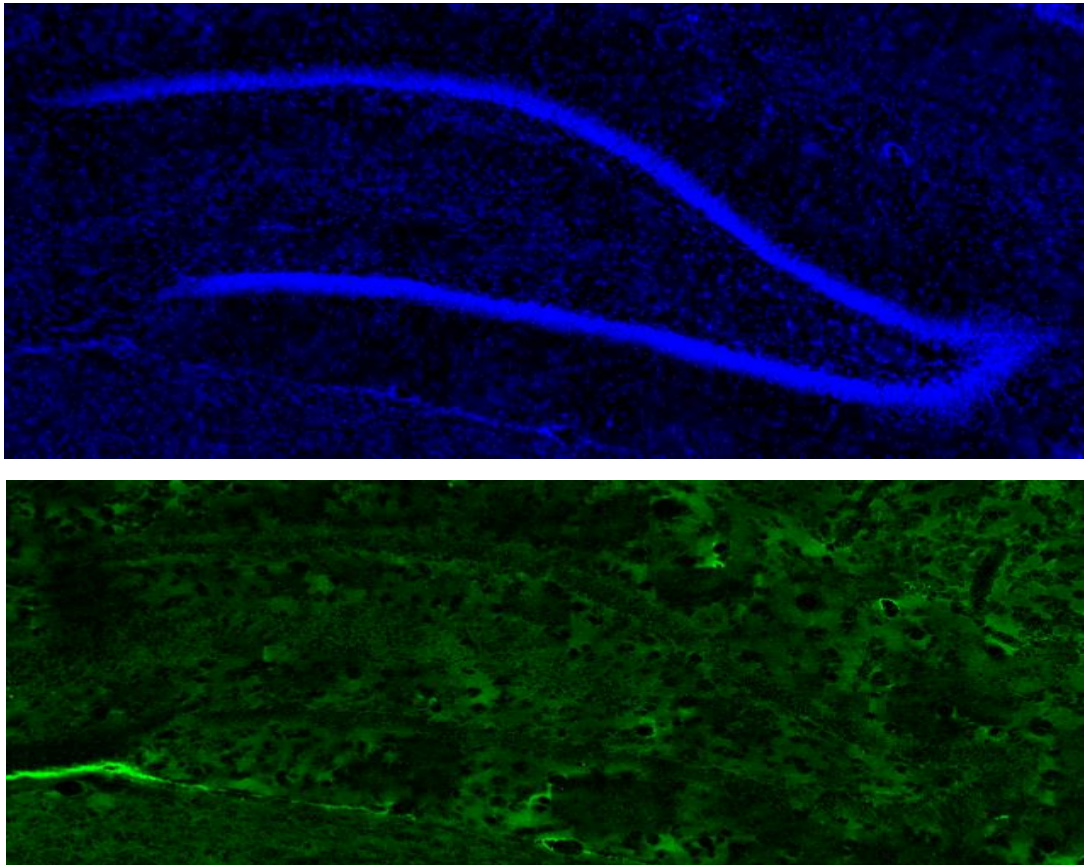


Figura 5: Reconstrucción en un único mosaico del GD de una rata joven con los dos canales de fluorescencia (DAPI y BrdU). En la imagen superior se muestra la fotografía realizada con el filtro de DAPI y en la inferior de BrdU.

La cuantificación se hizo manualmente con el programa de Image J siguiendo los criterios establecidos anteriormente. Al tratarse de un experimento de doble ciego, durante el recuento se desconoció si el sujeto pertenecía al grupo de DCS o PBS. Se detectaron los cuerpos celulares con el mosaico de BrdU considerando el tamaño y la intensidad de fluorescencia, así como su ubicación en el GD y seguidamente se comprobó con el mosaico de DAPI si coincidía con un cuerpo celular. Una vez realizado el recuento se sumó el número de nuevas células de cada sujeto y se multiplicó por 6 el número total de células encontradas ya que entre cada sección de HPC que se contabilizaba se habían descartado 6 (Figura 6).

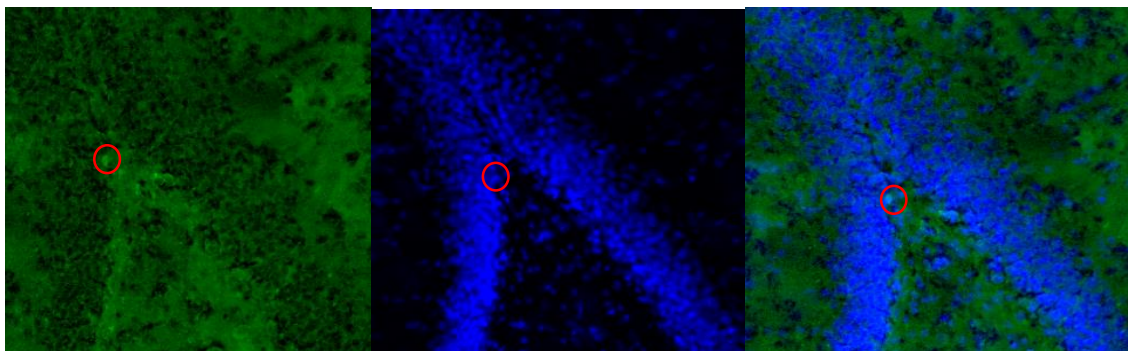


Figura 6: De izquierda a derecha: visualización de una región del GD del HPC en un corte coronal del sujeto 7 del grupo de ratas jóvenes con el canal fluorescente de BrdU en el que se detecta una nueva posible célula. La fotografía central se trata de la misma región pero con el canal DAPI, confirmando que se trata de un cuerpo celular. La última fotografía es una fusión de ambas fotos en una sola realizada con el programa ImageJ.

3.4. Análisis y tratamiento de la información

Después de obtener todas las imágenes necesarias y realizar la cuantificación se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo y comparativo mediante el programa IBM SPSS Statistics 22.0. Por lo tanto, se procedió a:

1. La cuantificación de la supervivencia de nuevas células en el HPC del total de la muestra y la comparación de medias entre grupos mediante un análisis de la variancia (ANOVA de dos vías), en la que se presenta el factor edad (ratas jóvenes y envejecidas) y la droga (inyección de DCS o PBS) como variables independientes y el número de nuevas células como variable dependiente.
2. La comparación de medias entre grupos mediante un ANOVA de una vía distinguiendo cuatro grupos: ratas jóvenes con PBS, ratas jóvenes con DCS, ratas viejas con PBS y ratas viejas con DCS. También se realizó un diagrama de cajas. Se eliminaron los 3 sujetos atípicos y se volvió a realizar el análisis estadístico con un total de 19 sujetos.

4. RESULTADOS

En primer lugar se realizó una evaluación cuantitativa de las fotografías realizadas con el Microscopio Óptico de Epifluorescencia Nikon TE2000e sobre la neurogénesis en el GD del HPC en ratas jóvenes y viejas. Se observaron cuerpos celulares de tamaño normal y pequeño en todos los sujetos, con un número destacablemente menor en el grupo de ratas viejas. En segundo lugar, encontramos una mayor fluorescencia en el hilo en el grupo de las ratas viejas, debido a la segregación de una sustancia llamada lipofuscina o pigmento de desgaste. La lipofuscina es un pigmento de fluorescencia propia que aparece durante el envejecimiento y puede observarse en la figura 7. Una vez obtenido el número de nuevas células por sujeto, se realizó un análisis cuantitativo para la comparación de medias entre grupos. Se utilizó el modelo ANOVA de dos vías (ANOVA two-ways) con la edad y el tratamiento como variables independientes y la media del número total de nuevos cuerpos celulares como variable dependiente.

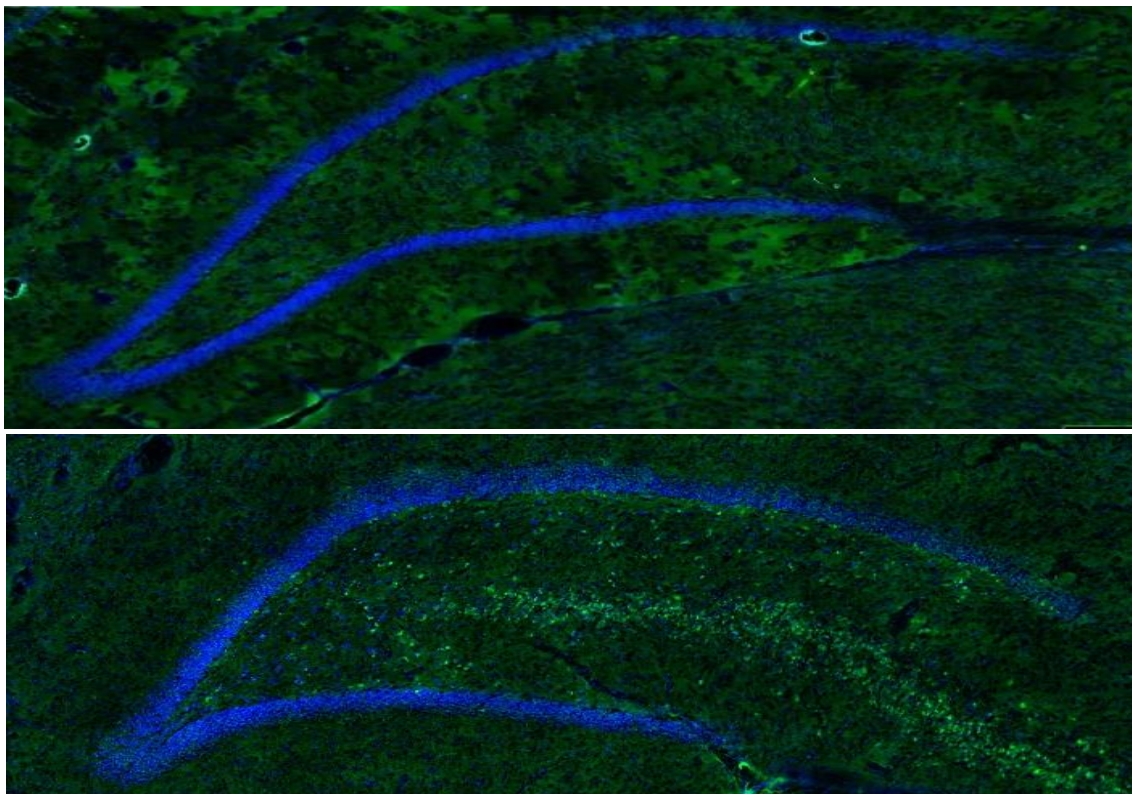


Figura 7: Representación de dos mosaicos del GD con los canales de DAPI y BrdU de una rata joven (arriba) y una rata vieja (abajo). En la fotografía de abajo se observa mucha más fluorescencia, debido a la lipofuscina. Se confirma que en ratas viejas hay poca supervivencia celular dado que el canal de DAPI muestra que la fluorescencia observada no es de un cuerpo celular.

4.1. Envejecimiento y Neurogénesis

La tabla 1 muestra que el número de células nuevas es mayor en ratas jóvenes ($\bar{x}=66.00$) que en las ratas viejas ($\bar{x}=24.00$); esta diferencia se confirmó con el análisis de la variancia de dos vías ($F_{1,20}=26,894$, $p<0.001$). Estos resultados concuerdan con otros estudios anteriores y confirman que existe una disminución de la neurogénesis conforme aumenta la edad.

Tabla I: comparación de medias y error estándar entre el grupo de ratas jóvenes y viejas

		Comparación de medias entre grupos						
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Dif. medias	P	IC95%
Nuevas células	Jóvenes	11	66.00	20.435	6.161	42.00	<0.001	52.27 a 79.73
	Viejas	10	24.00	14.422	4.561			13.68 a 34.32

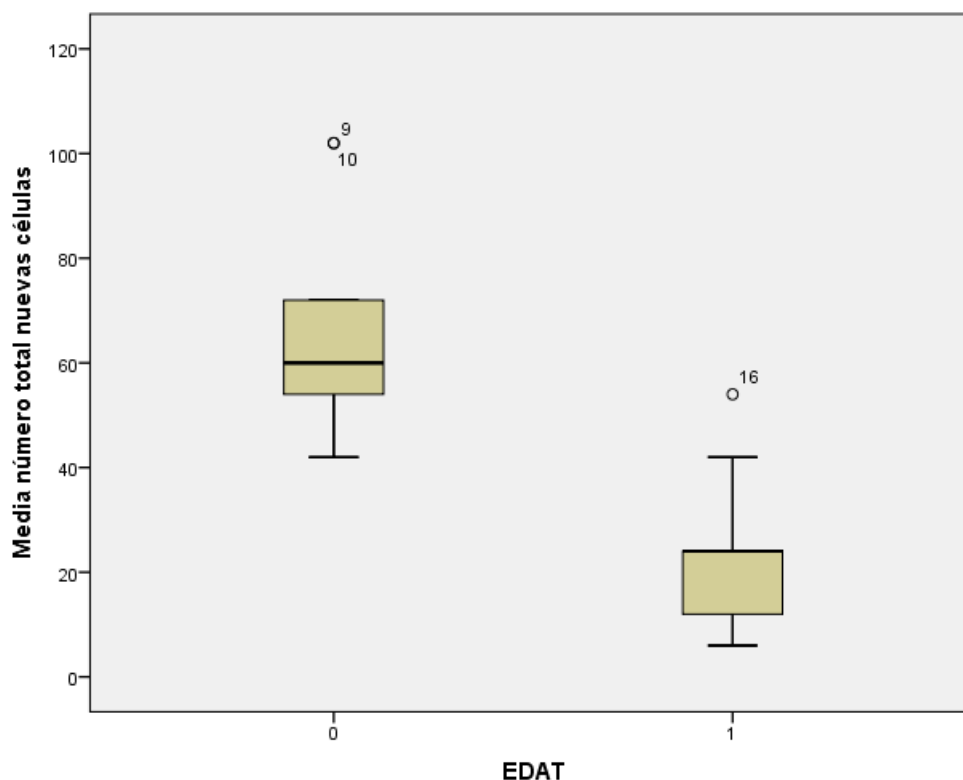


Figura 8: Diagrama de cajas del número total de neuronas en función de la edad (0=ratas jóvenes; 1 = ratas viejas)

En la figura 8 se observa gráficamente en un diagrama de cajas ambos grupos edad. Este diagrama basado en cuartiles (Q) representa la mediana ($Q2$ o *percentil 75*), el percentil

25 (*Q1*) y 75 (*Q3*). En el gráfico observamos que la mediana en grupo de ratas jóvenes es de 58 cuerpos celulares y en ratas viejas de 20, indicando la tendencia central de cada grupo. También permite detectar valores atípicos (*outliers*) como son los sujetos 9, 10 y 16. Tal como se puede observar hay una gran diferencia en la supervivencia de nuevas células entre ratas viejas y jóvenes. El grupo de ratas jóvenes presenta mucha más variabilidad en el número de neuronas nuevas que el grupo de ratas viejas ($SD = 20.435$ y 14.422 , respectivamente). En la tabla 1 se pueden ver estos datos.

4.2. DCS y Neurogénesis

Se estudió el efecto de la DCS sobre la neurogénesis, comparando las medias entre el grupo al que se administró DCS y PBS. El análisis estadístico mostró que la media del número total de nuevas células en ratas con DCS ($\bar{x} = 49.09$) no era estadísticamente significativa ($F_{1,20}=0.351$, $P=0.561$) respecto al grupo con PBS ($\bar{x} = 42.60$). Además, se observó que la desviación estándar en ratas con PBS era ligeramente superior a las ratas con DCS ($SD = 29.455$ y 26.942 respectivamente) (Tabla 2).

Tabla 2: comparación de medias del número de nuevas células en función del tratamiento

		Comparación de medias entre grupos						
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Diferencia medias	P	IC95%
Nuevas células	PBS	10	42.60	29.455	9.315	-4.800	0.561	21.53 a 63.67
	DCS	11	49.09	26.942	8.123			30.99 a 67.19

4.3. Efectos de la DCS en la neurogénesis de ratas viejas

Después de estudiar los efectos de la edad y el tratamiento por separado, se analizó el efecto conjunto en el número de nuevas células. Los resultados determinaron que no existe interacción entre la edad y el tratamiento ($F_{1,20}=0.351$, $P=0.561$.) Por lo tanto, la DCS no evitó el declive en la supervivencia celular que se observa normalmente en el envejecimiento.

Finalmente se realizó un análisis ANOVA de una vía (ANOVA one-way) distinguiendo cuatro grupos: ratas jóvenes con PBS, jóvenes con DCS, viejas con PBS y viejas con DCS. En la tabla 3 se muestran los estadísticos descriptivos de los 4 subgrupos. La media para las ratas jóvenes con PBS y DCS (\bar{x} =66.00 y SD=22.847; \bar{x} =66.00 y SD=20.435, respectivamente) fue superior a los grupos de ratas viejas PBS y DCS (\bar{x} =19.20 y SD=7.823; \bar{x} =28.80 y SD= 18.687). Los resultados obtenidos en los cuatro grupos de ratas fueron los mismos que los obtenidos mediante el análisis ANOVA de dos vías de factores (edad y tratamiento). Es decir, el grupo de ratas viejas con DCS no mostró una mayor supervivencia celular en el GD.

Tabla 3: Datos descriptivos de los 4 grupos experimentales

Grupos	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza del 95% de la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
JÓVENES PBS	5	66,00	22,847	10,218	37,63	94,37	42	102
JÓVENES DCS	6	66,00	20,435	8,343	44,55	87,45	42	102
VIEJAS PBS	5	19,20	7,823	3,499	9,49	28,91	6	24
VIEJAS DCS	5	28,80	18,687	8,357	5,60	52,00	12	54
Total	21	46,00	27,648	6,033	33,41	58,59	6	102

También se realizó una comparación múltiple mediante el modelo de Bonferroni (Tabla 4). El análisis mostró diferencias significativas entre los grupos de ratas jóvenes con PBS y viejas con PBS ($p=0.006$), jóvenes con PBS y viejas con DCS ($p=0.033$), jóvenes con DCS y viejas con PBS ($p=0.004$) y jóvenes con DCS y viejas con DCS ($p=0.024$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratas jóvenes con PBS y DCS ($p=1.00$) y viejas con DCS y PBS ($p=1.00$). Por lo tanto, se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratas viejas y jóvenes pero no entre los grupos de DCS y PBS en cada uno de los grupos de edad.

Tabla 4: Comparaciones múltiples de medias mediante el método de Bonferroni

	(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de Confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Bonferroni	JÓVENES PBS	JÓVENES DCS	,000	11,202	1,000	-33,43	33,43
		VIEJAS PBS	46,800*	11,700	,006	11,89	81,71
		VIEJAS DCS	37,200*	11,700	,033	2,29	72,11
	JÓVENES DCS	JÓVENES PBS	,000	11,202	1,000	-33,43	33,43
		VIEJAS PBS	46,800*	11,202	,004	13,37	80,23
		VIEJAS DCS	37,200*	11,202	,024	3,77	70,63
	VIEJAS PBS	JÓVENES PBS	-46,800*	11,700	,006	-81,71	-11,89
		JÓVENES DCS	-46,800*	11,202	,004	-80,23	-13,37
		VIEJAS DCS	-9,600	11,700	1,000	-44,51	25,31
	VIEJAS DCS	JÓVENES PBS	-37,200*	11,700	,033	-72,11	-2,29
		JÓVENES DCS	-37,200*	11,202	,024	-70,63	-3,77
		VIEJAS PBS	9,600	11,700	1,000	-25,31	44,51

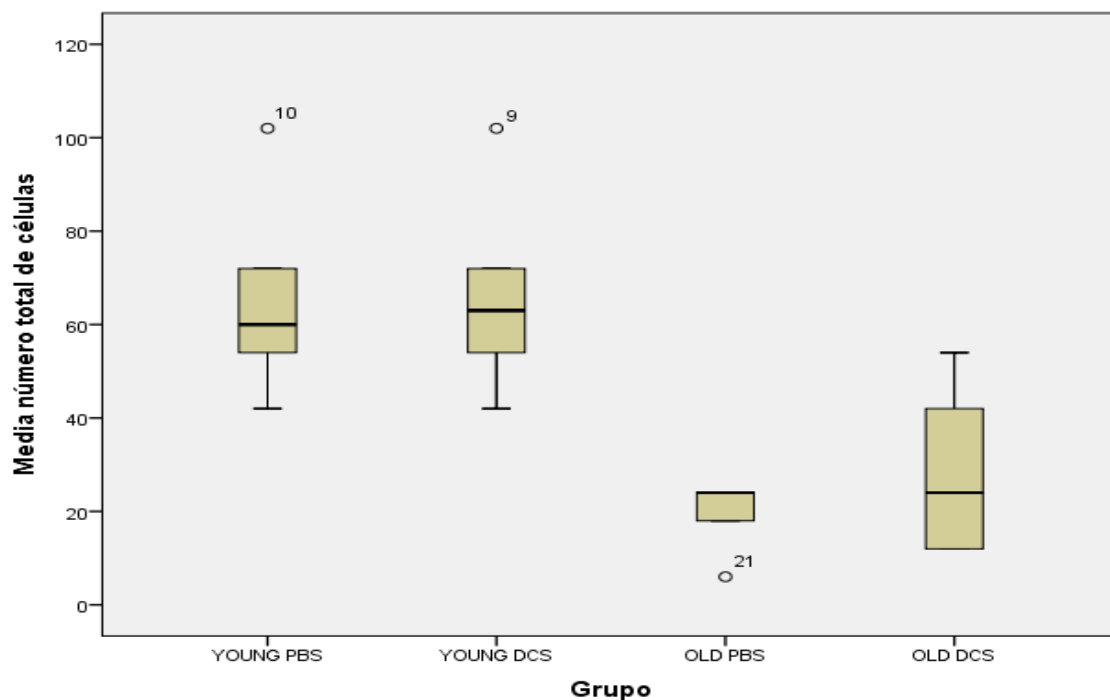


Figura 9: Diagrama de cajas de los 4 grupos que forman parte del estudio donde se muestra la mediana de nuevos cuerpos celulares. Se observan como valores atípicos los sujetos 9, 10 y 21.

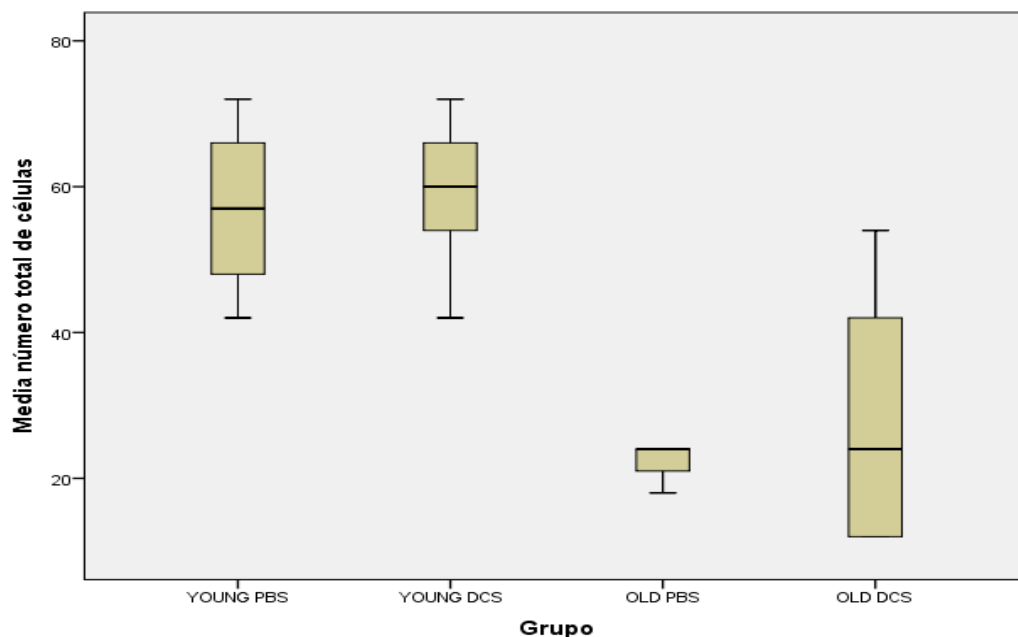


Figura 10: Diagrama de cajas de los 4 grupos que forman parte del estudio donde se muestra la mediana de nuevos cuerpos celulares una vez eliminados los valores atípicos.

Así mismo, se realizó un diagrama de cajas que se presenta en la figura 9. Se puede observar 3 sujetos atípicos, alejándose significativamente de la mediana de su grupo. Una vez eliminados los sujetos atípicos se realizó el análisis estadístico con los 18 sujetos restantes. Los nuevos resultados no mostraron diferencias respecto a los iniciales por lo que se mantuvieron los primeros análisis. En la figura 10 se puede observar el nuevo diagrama de cajas sin los valores atípicos.

En la figura 9 se observa que en los grupos Young PBS y Young DCS tienen el bigote superior ($X_{\text{máx}}$, Q3) es más corto que el inferior ($X_{\text{mín}}$, Q1), indicando que el 25% de sujetos con más neuronas están más concentrados que el 25% con menor número. En el grupo Old DCS, la parte inferior de la caja es mayor que la superior, esto quiere decir que el número de sujetos comprendidos entre el percentil 50 y 75 de la población se encuentran más dispersos que entre el percentil 25 y el 50. Observamos que el desplazamiento de las gráficas de caja es mayor entre los grupos de ratas jóvenes (DCS y PBS) respecto al grupo de ratas viejas (DCS y PBS). No obstante, no se observan diferencias entre el grupo de ratas jóvenes con DCS y PBS. Ambos grupos presentan una dispersión parecida. Al eliminarse los valores atípicos, observamos en la figura 10 una distribución más homogénea en los grupos de ratas jóvenes de DCS y PBS. En el caso de

ratas viejas con PBS mientras que la distribución y mediana es similar al de la figura 9. En el grupo de ratas viejas con DCS observamos una mayor diferencia, así el bigote superior es más largo que el inferior, indicando que el 25% de sujetos con menos neuronas están mucho más concentradas que el 25% con más neuronas. En la figura 11 se muestran gráficamente los resultados obtenidos en cuanto a nuevas células en cada grupo del estudio.

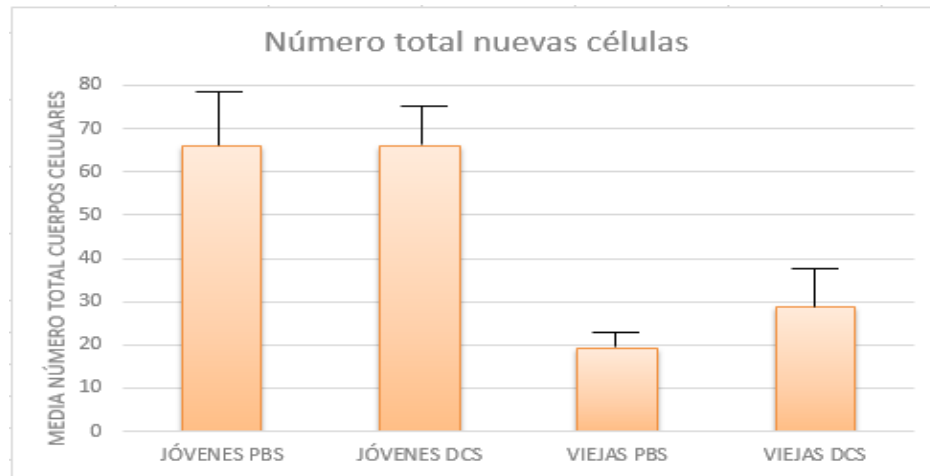


Figura 11: Gráfico de barras que muestra el número de nuevas células encontradas en los 4 grupos del estudio.

5. Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que las ratas viejas presentan un número significativamente menor de células nuevas en el GD en comparación con las ratas jóvenes. Estos resultados indican una reducción de la neurogénesis relacionada con el envejecimiento que podría correlacionar con los problemas mnemónicos y de aprendizaje que se presentan en edades avanzadas. Debido a que la densidad de células en el GD se mantiene constante durante la vejez, diversos estudios han sugerido que el declive cognitivo relacionado con la edad no estaría mediado por una disminución en el número de células sino por la reducción de la tasa de proliferación (Kuhn, Dickinson-Anson, & Gage, 1996, Gould, Beylin, Tanapat, Reeves & Shors, 1999). Así pues, los resultados de nuestro estudio han sido los esperados de acuerdo a las investigaciones previas que han demostrado una reducción de la neurogénesis hipocampal durante el envejecimiento. Los animales de edad avanzada tienen una menor proliferación, diferenciación y supervivencia de nuevas células en comparación con animales jóvenes. Este declive empieza entre los uno y dos meses de edad y continua de manera progresiva con el paso del tiempo (Lee, Clemenson & Gage, 2012).

El estudio de la neurogénesis hipocampal en adultos, concretamente en el GD, ha sido un tema de relevancia en numerosos trabajos por su relación con el rendimiento en tareas mnemónicas. Una de las tareas de memoria espacial más utilizada en estudios de neurogénesis es el LAM. Se ha demostrado que una tasa baja de neurogénesis en ratas adultas está más relacionada con un deficiente rendimiento en esta tarea que el hecho padecer una lesión del HPC (Wojtowicz, Askew & Gordon Winocur, 2008). La generación de nuevas neuronas es un tipo de plasticidad sináptica directamente relacionada con los procesos mnemónicos. De acuerdo con nuestro estudio y otros anteriores, el deterioro del aprendizaje y la memoria podría ser una consecuencia de la disminución de la neurogénesis en el GD del HPC durante el envejecimiento (Bolognin, Buffeli, Puoliväli & Iqbal, 2014). Se han encontrado ciertas semejanzas entre la neurogénesis de las ratas y los humanos, así como su relación con el ambiente (Lazarov & Marr, 2013). Estos resultados demuestran la importancia del estudio de la neurogénesis y su potenciación para la prevención del deterioro cognitivo relacionado con la edad así como de las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

En este sentido, en nuestro trabajo se ha pretendido comprobar la capacidad de la DCS para potenciar la neurogénesis en ratas envejecidas. Al contrario de lo esperado, los resultados mostraron que la DCS no aumentaba el número de células nuevas en el HPC de las ratas viejas. A pesar de que en ambos grupos de ratas, jóvenes y viejas, a los que se les administró la DCS presentaron un mayor número de cuerpos celulares que las que se les administró PBS, la diferencia no fue estadísticamente significativa, por lo que podemos concluir que la DCS no tiene un efecto sobre la neurogénesis. Estos estudios no concuerdan con las investigaciones anteriores en los que se ha observado un incremento de la proliferación celular cuando se ha administrado DCS durante 8 días (Sultan, Gebara, Moullec & Toni, 2013). Estas diferencias podrían ser explicadas por la metodología aplicada: se utilizaron ratas de 8 semanas de edad a las que se les inyectó DCS durante 8 días seguidos. Un día después de la inyección de DCS, se les administró 3 inyecciones de BrdU en intervalos de 2h y fueron sacrificadas 2h después de la última dosis. Además se realizó un doble marcaje de BrdU y el marcador neuronal Neu-N. En nuestro experimento la BrdU fue administrada en la semana de descanso entre el aprendizaje de las dos tareas HPC dependientes, la TSPA y el LAM, de manera no coincidente con la inyección de DCS. Por lo tanto, en nuestro experimento la BrdU fue incorporada en las células en proliferación en ausencia de la DCS. Estas diferencias metodológicas son claves para entender las diferencias en los resultados y sugieren que para encontrar efectos de la DCS en la neurogénesis la inyección de DCS debería ser contingentes a la de BrdU.

Algunos autores (Epp, Haack & Galea, 2011) consideran que muchos estudios relacionados con la neurogénesis no encuentran diferencias significativas en el número de células entre grupos debido a que no se estudia la proliferación. De acuerdo con esto, el bajo número de nuevas células en ratas viejas que hemos obtenido, podría deberse a que en este trabajo se ha estudiado la supervivencia celular y no la proliferación. El estudio de la supervivencia de nuevas neuronas supone el retraso del sacrificio del animal después de la inyección de BrdU. Al estudiar la proliferación, la demora hasta el momento de sacrificio hubiera sido mucho menor, incluso pocas horas después de la inyección de BrdU (Mandyam, Harburg & Eisch, 2007). En este sentido, un estudio anterior (Gould, Beylin, Tanapat, Reeves & Shors, 1999) mostró resultados diferentes dependiendo del momento del sacrificio del animal: una mayor tasa de neurogénesis cuando el sacrificio se realizaba en la primera semana después de la inyección de BrdU en comparación a cuando este se realizaba a las dos semanas. Esto supone que si lo que se estudia es la

supervivencia celular en lugar de la proliferación, la muerte de algunas de las neuronas marcadas con BrdU con el paso del tiempo hace que se observe una menor neurogénesis. Por otro lado, nuestro estudio no ha investigado si las células nuevas encontradas son neuronas o células gliales. Sería necesario realizar un doble marcaje con doblecortina (DCX) para diferenciar entre la supervivencia celular de neuronas y células gliales. Este procedimiento permitiría hacer un conteo de aquellas células que expresan BrdU y DCX, asegurando la presencia de neuronas.

Con todo, la DCS se ha mostrado como una droga eficaz para mejorar la memoria en ratas envejecidas (Baxter, Lanthorn, Frick, Golski, Wan, & Olton, 1994) y también en ratas jóvenes. Sin embargo, estos efectos no se dan siempre, dado que si se realiza un pre-entrenamiento no espacial o espacial antes de la administración de la DCS, se bloquea la mejora en dichas pruebas de aprendizaje. (Aura, Riekkinen & Riekkinen, 1998; Aura & Riekkinen, 2000). Así mismo, se ha visto que la DCS actúa como potenciador del reaprendizaje en la realización de una tarea de discriminación simple de olores (DSO) en ratas jóvenes. (Villarejo-Rodríguez, Vale-Martínez, Guillazo-Blanch & Martí-Nicolovius, 2010). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron un rendimiento significativamente mejor en el reaprendizaje de la tarea en las ratas a las que les fue inyectada la DCS en la corteza prefrontal en comparación con el grupo control. Por lo tanto, la facilitación de los procesos de aprendizaje y memoria con DCS podría involucrar otros mecanismos neurofisiológicos diferentes a la neurogénesis hipocámpal, como por ejemplo, la potenciación de la transmisión glutamatergica a través de la facilitación de la actividad de los receptores NMDA. Algunos estudios sugieren además que los efectos de la DCS aumentan al administrarse junto con la tetrahidroaminoacridina (THA). La THA es un inhibidor de la colinesterasa y bloqueador de los canales de potasio, lo cual incrementa la liberación de acetilcolina. En ratas viejas se ha visto que la administración conjunta y de forma continua de DCS y THA mejora la resolución de pruebas de aprendizaje como la TSPA o el LAM, indicador del aumento de los procesos cognitivos como la atención, orientación y memoria. (Aura, Riekkinen & Riekkinen, 1998; Aura & Riekkinen, 2000). Una nueva línea de investigación sería el estudio de la DCS y otros fármacos potenciadores de la transmisión colinérgica, como el THA, para disminuir los déficits cognitivos que se producen en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

6. Conclusiones

Según los resultados obtenidos y la literatura revisada, podemos llegar a una serie de conclusiones. En primer lugar, en concordancia con los trabajos anteriores, encontramos que la supervivencia celular en el HPC en ratas viejas es significativamente menor en comparación al grupo de ratas jóvenes. No obstante, parece que la DCS no detiene significativamente la disminución de la supervivencia celular, ya que las diferencias entre los grupos experimental y control no son estadísticamente significativas. En estudios futuros sería conveniente estudiar si esta disminución correlaciona positivamente con la ejecución de las tareas de aprendizaje y si la DCS puede potenciar la memoria a través de mecanismos diferentes a la neurogénesis hipocampal. Además, futuras investigaciones deberían determinar si lo que se reduce con la edad es la proliferación y/o supervivencia de neuronas y/o de células gliales en el HPC.

7. Agradecimientos

Antes de dar por concluido el trabajo, queremos expresar nuestro agradecimiento a las personas que con su colaboración han ayudado a hacer posible este trabajo.

En primer lugar, queremos agradecer a nuestra tutora y profesora Margarita Martí su atención y apoyo en todo el proceso, así como su capacidad para enseñar y motivarnos.

En segundo lugar queremos agradecer a Patricia Molina su colaboración y apoyo incondicional, su ayuda nos ha hecho cada tarea más fácil y agradable.

Por último queremos agradecer a Núria Barba la formación y el apoyo dados en el proceso técnico de microscopía así como su predisposición a ayudarnos en la resolución de las dificultades que se han ido presentando a lo largo de la investigación.

Referencias bibliográficas

Aura, J., Riekkinen, M. & Riekkinen, P. (1998). Tetrahydroaminoacridine and D-cycloserine stimulate acquisition of water maze spatial navigation in aged rats. *European journal of Pharmacology*. 342, 15-20.

Aura, J. & Riekkinen, P. (2000). Pre-training blocks the improving effect of tetrahydroaminoacridine and D-cycloserine on spatial navigation performance in aged rats. *European Journal of Pharmacology*, 390, 313-318.

Arrias, O., Olivares, T. & Drucker, R. (2007). Neurogénesis en el cerebro adulto. *Journal of neurology*, 44 (9), 541-550.

Arruda-Carvalho, M., Sakaguchi, M., Akers, K.G., Josselyn, S.A & Frankland, P.W. (2011). Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories. *The Journal of Neuroscience*, 31(42), 15113-15127.

Baxter, M., Lanthorn, T., Frick, M., Golski, S., Wan, R, & Olton D. (1994). D-cycloserine, a novel cognitive enhancer, improves spatial memory in aged rats. *Neurobiology of aging*, 15 (2), 207-13.

Bishop, N. & Yankner, B. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464, 529-535.

Bolognin, S., Buffeli, M., Puoliväli, J. & Iqbal, K. (2014). Rescue of cognitive-aging by administration of a neurogenic and/or neurotrophic compound. *Neurobiology of aging*, 35, 2134-2146.

Cameron, H. & Glover, L. (2015). Adult neurogenesis: Beyond Learning and Memory. *Annual Review of Psychology*, 66, 53-81.

Drew, L., Fusi, S. & Hen, R., (2013). Adult neurogénesis in the mammalian hippocampus: Why the dentate gyrus. *Learning & Memory*, 20 (12), 710-729.

Epp, J. R., Haack, A. K., & Galea, L. a M. (2011). Activation and survival of immature neurons in the dentate gyrus with spatial memory is dependent on time of exposure to spatial learning and age of cells at examination. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(3), 316–25.

Gould, E., Beylin, a, Tanapat, P., Reeves, a, & Shors, T. J. (1999a). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2(3), 260–265.

Hofmann, S., Meuret A., Smits J., Simon N., Pollack M., Eisenmenger, K. et al (2006). Augmentation of exposure therapy with D-cycloserine for social anxiety disorder. *Archives of General Psychiatry*, 63, 298–304.

Izquierdo, A. (2001). Envejecimiento cerebral normal. *Mexica Journal of Neuroscience*. 2 (4), 197-202.

Jurd, R. (2011). TiNS Special Issue: Hippocampus and Memory. *Trends in Neurosciences*. 34 (10), 499-500.

Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F.H. (1996) Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 16(6), 2027-2033.

Lazarov, O., & Marr, R. (2013). Of mice and men: neurogenesis, cognition and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5(August), 1-8.

Lee, S. W., Clemenson, G.D. & Gage, F.H. (2012). New neurons in an aged brain. *Behavioural Brain Research*, 227, 497-507.

Mandyam, C.D., Hardburg, G.C. & Eisch, J. (2007) Determination of the key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. *Neuroscience*, 146, 108-122

Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C., Lin, J., Tsien, R. & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*. 511, 348-52.

Ren, J., Li, X., Zhang, X., Wang, Y. & Ma, Y. (2013) The effects of intra-hippocampal microinfusion of D-cycloserine on fear extinction, and the expression of NMDA receptor subunit NR2B and neurogenesis in the hippocampus in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 44, 257-264.

Ressler, K.J., Rothbaum, B.O., Tannenbaum, L., Anderson, P., Graap & K., Zimand, E. (2004). Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. *Arch Gen Psychiatry*, 61, 1136–1144.

Samson, R.D & Barnes, C.A. (2013) Impact of aging brain circuits on cognition. *European Journal of Neuroscience*, 37, 1903-1915.

Speisman, R. et al. (2013). Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiology of Aging*. 34, 263-274.

Sultan, S., Gebara, E., Moullec, K. & Toni, N. (2013). D-serine increases adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in neurogenesis*, 7, 1-10.

Wojtowicz, J.M., Askew, M.L. & Winocur, G. (2008). The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. *European Journal of Neuroscience*, 27, 1494-1502.

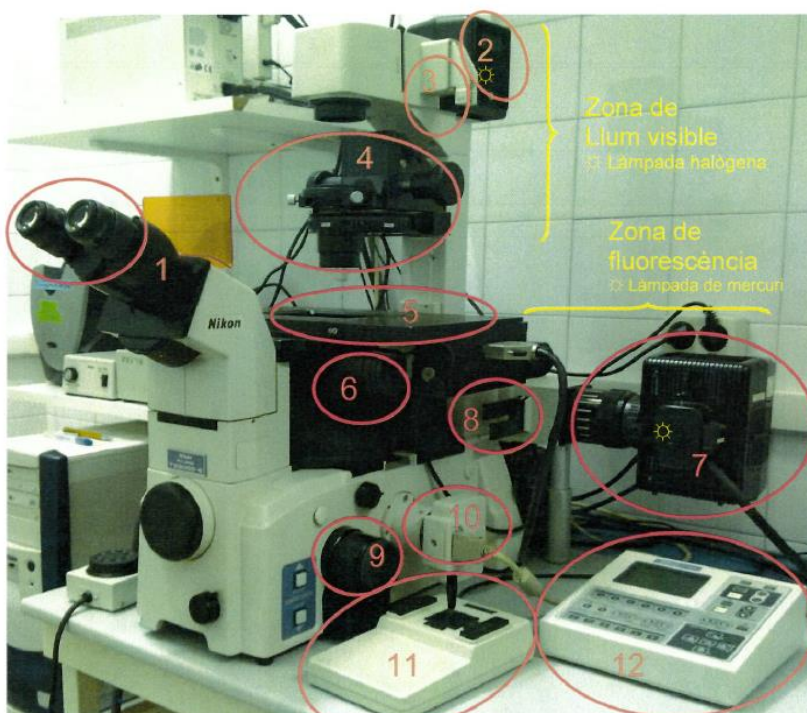
Yankner, B., Lu.T. & Loerch, P. (2008). The aging Brain. *Annu.Rev.Pathol.Mech*, 3, 41-66.

Anexo 1:

Protocolo sobre el uso del microscopio Nikon TE2000e y del programa MetaMorph

MICROSCOPIA DE FLUORESCÈNCIA – ECLIPSE TE2000-E

1. PARTS DEL MICROSCOPI



1. Oculars
2. Font de llum de l'espectre visible (làmpada DC 12V, 100 W)
3. Filtres per ajust del contrast en camp clar i contrast de fases GIF / NCB / ND / D
4. Condensador llum visible
5. Platina motoritzada (x,y)
6. Shutter manual
7. Font de llum 360-800 nm, per a fluorescència (làmpada de vapor de mercuri)
8. Filtres fluorescència. Redueixen la intensitat d'il·luminació: ND4 ND8
9. Micròmetre: Focus fi
10. Càmera Nikon
11. Joystic: Moviment de la Platina (x,y)
12. Control Remot del microscopi: T-RCP

1. Condensador espectre visible

- a. Lents
- b. Obertura del diafragma
ATENCIÓ NO GIRAR MANUALMENT!!!
- c. Cargol per centrar el diafragma
- d. Focus del condensador (distància)



2. Revòlver d'objectius. Són invertits, els portaobjectes guanyen nitidesa si es posen a l'inrevés.

10x	/ 0,3	
20x *	/ 0,45	Plan Fluor
40x *	/ 0,6	Plan Fluor
100x	/ 1,3 Oil	Plan Fluor

3. Ajust llum visible
4. Macromètric manual (focus gruixut)
5. Micromètric (focus fi)
6. Calibració del diafragma. **NO TOCAR!!**
7. Càmera Hamamatsu
8. Port càmera. No operatiu.



En el nostre cas no ens interessen tots els números, ja que només ens centrarem en les parts que són necessàries per veure amb microscopi de fluorescència. Observarem pels **oculars** (1) i col·locarem el portaobjectes amb la mostra en la cavitat que trobem sobre la **platina motoritzada** (5). La col·locació del portaobjectes en aquest cas difereix dels microscopis òptics normals: hem de col·locar el portaobjectes del revés, amb el cubreporta cap a sota (perquè els objectius estan invertits) perquè així guanyarem nitidesa. Per moure aquesta platina motoritzada utilitzarem el **joystic** (11), mentre que podrem regular la velocitat del moviment del joystic mitjançant el botó que hi ha a l'esquerra. A més, també disposa del **T-RCP, control remot del microscopi** que ens permetrà controlar quin shutter fem, quin objectiu, quin filtre...

Per observar adequadament la mostra, enfocarem amb el **macromètric** (4) i després amb el **micromètric**, que a la primera imatge el tenim a la dreta del microscopi (9) però també el podem tenir en un aparell mòvil (5, segona imatge) per fer-nos més còmode l'enfocament si estem ja mirant i manipulant la imatge a l'ordinador i no mirant pels oculars.

En la segona imatge veiem els **objectius** (2), en el nostre cas ens interessa utilitzar l'objectiu 20X, perquè ens permetrà veure adequadament les mostres.

2. PROCEDIMENT I METODOLOGIA

2.1. Connexió del microscopi i equip

Per treballar amb fluorescència (caixa de fluorescència Nikon), cal connectar-la, tenint en compte una sèrie de conceptes:

- 1) Pressionar el botó POWER (1) fins que s'encengui el indicador verd.
- 2) Pressionar el botó IGNITION (2) fins que el indicador taronja s'estabilitzi, deixi de parpadejar. Normalment hem d'apretar el botó d'ignition durant uns 2-3 segons.

Atenció! Si l'indicador taronja continua parpellejant encara que apremem el botó ignition pot ser degut a:

- ✓ La làmpada està **massa calenta** → caldrà esperar uns **15 minuts** des de l'última sessió (existeix un mecanisme de seguretat per evitar el risc d'explosió si s'encèn la làmpada en calent).
- ✓ Hi ha problemes amb la làmpada → caldrà avisar a les **responsables** (Roser o Elisabet).



NOTA!

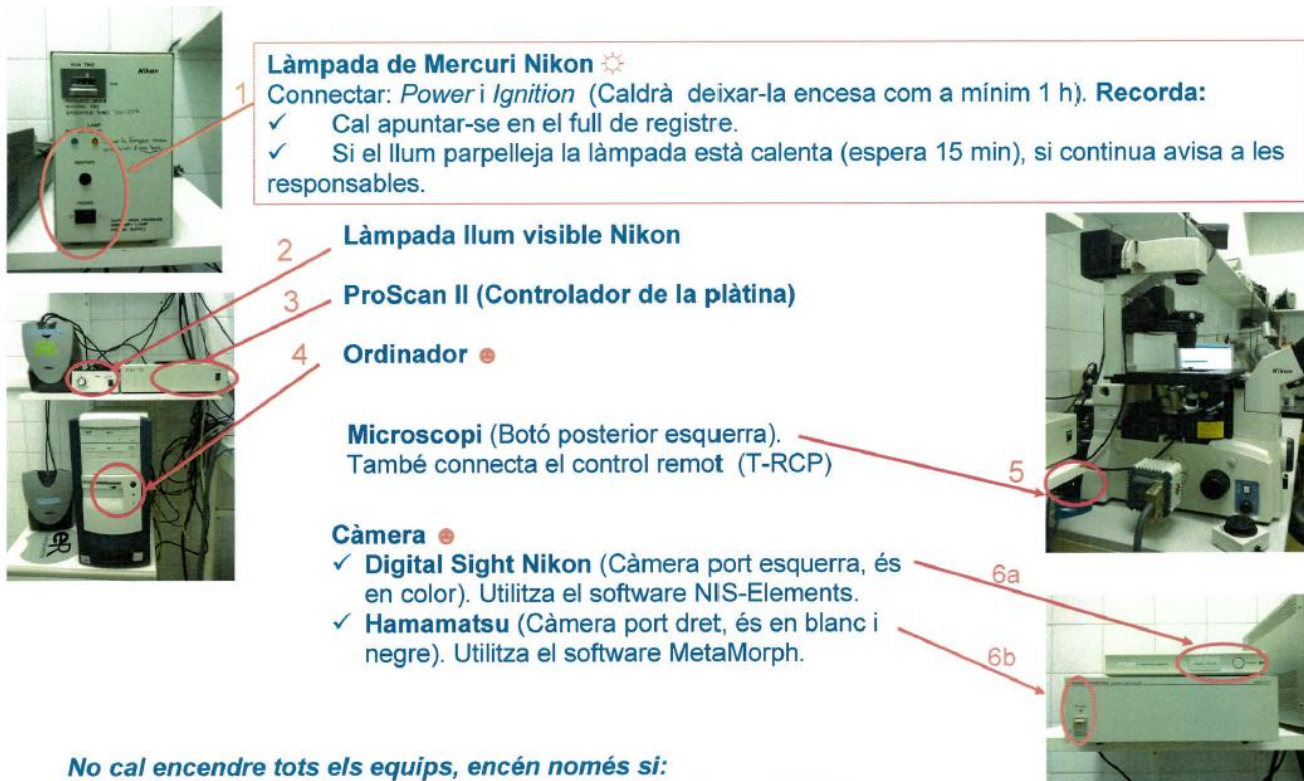
- Un cop encesa la làmpada no es pot apagar **abans d'una hora**.
- No es pot reencendre la làmpada fins passats **10 minuts** des que es va apagar.

- 3) Per últim, el **nombre d'hores actives de la làmpada de Hg** queden reflectides en el visor de la caixa, superiorment.

Per tal de detectar possibles anomalies en la làmpada, caldrà que al final de cada sessió apuntem l'hora d'encesa de la làmpada i d'apagada en el "Registre d'Ús de fluorescència".

A l'hora d'encendre tots els components de l'equip és essencial seguir el **següent ordre**:

1. Làmpada de Mercuri Nikon (làmpada de fluorescència)
2. Làmpada de llum visible Nikon
3. ProScan II per controlar la platina
4. Ordinador
5. Microscopi (interruptor posterior esquerre)
6. Càmera (Hamamatsu)
7. Software: METAMORPH. És molt important que obrim tot abans d'obrir el software, mentre que després per tancar-ho serà del revés: tancarem MetaMorph abans que tota la resta.



Làmpada de Mercuri Nikon ☀️
Connectar: *Power i Ignition* (Caldrà deixar-la encesa com a mínim 1 h). **Recorda:**
✓ Cal apuntar-se en el full de registre.
✓ Si el llum parpelleja la làmpada està calenta (espera 15 min), si continua avisa a les responsables.

Làmpada llum visible Nikon

ProScan II (Controlador de la platina)

Ordinador 💻

Microscopi (Botó posterior esquerra).
També connecta el control remot (T-RCP)

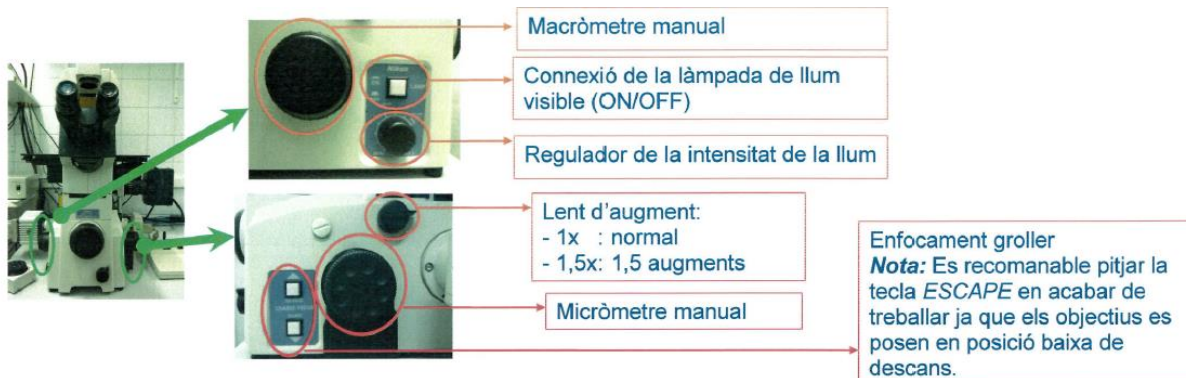
Càmera 📷
✓ **Digital Sight Nikon** (Càmera port esquerra, és en color). Utilitza el software NIS-Elements.
✓ **Hamamatsu** (Càmera port dret, és en blanc i negre). Utilitza el software MetaMorph.

5 (Microscopi)
6a (Càmera port esquerra)
6b (Càmera port dret)

No cal encendre tots els equips, encén només si:

☀️ **Vols treballar amb fluorescència** ⇒ Làmpada de Mercuri Nikon

💻 **Vols fer fotos i guardar imatges** ⇒ Ordinador i Càmera (només la que trïis)



1 (Macròmetre manual)
2 (Connexió de la làmpada de llum visible (ON/OFF))
3 (Regulador de la intensitat de la llum)
4 (Lent d'augment: - 1x : normal - 1,5x: 1,5 augments)
5 (Micròmetre manual)
6 (Enfocament groller)

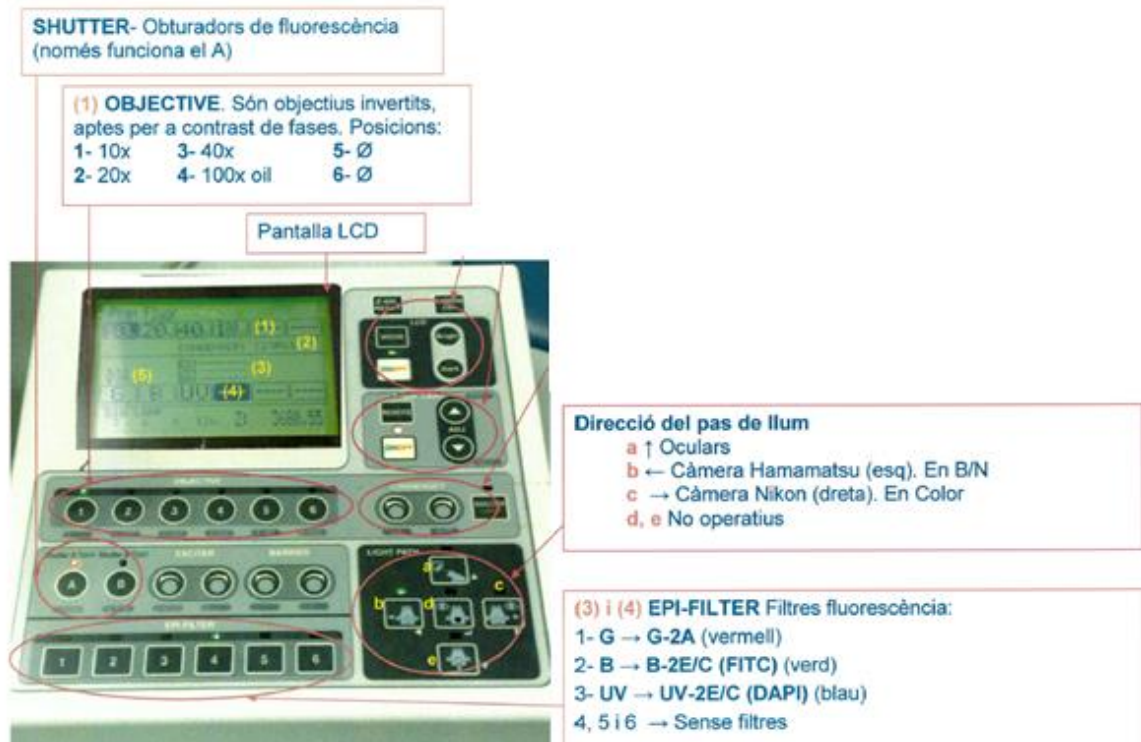
Nota: Es recomana pitjar la tecla **ESCAPE** en acabar de treballar ja que els objectius es posen en posició baixa de descans.

És molt important que la **lent d'augment** (dreta microscopi) estigui sempre a 1X i **no a 1,5X** perquè tot i que augmenta fa perdre molta fluorescència de la nostra mostra. Quan estiguem treballar, és recomanable prémer la tecla **escape** perquè els objectius baixin a la posició baixa de descans i posteriorment quan vulguem tornar a mirar, haurem de prémer **refocus**, que ens permetrà tornar els objectius al mateix punt i els tindrem enfocats com els teníem abans (no caldrà tornar a enfocar!).

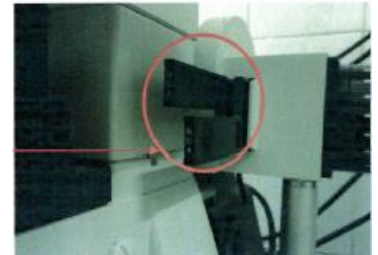
2.2. Controlador remot T-RCP

Veiem descrites les diferents parts del controlador remot T-RCP:

- Shutter: utilitzarem el **shutter A** sempre per mirar la mostra. Els shutter són obturadors de fluorescència i només funciona l'A. S'utilitzen per no il·luminar constantment la mostra i evitar que decaigui la fluorescència de manera sobtada. Depenen de quin color tingui té un significat diferent:
 - o Vermell: no passa la llum
 - o Verd: obert, deixa el pas a la llum.
- Objectius: utilitzem l'**objectiu 2** perquè necessitem 20X.
- Filtres de fluorescència (EPI-FILTER):
 1. *No el farem servir*
 2. **BrdU** – excita en blau i emet la fluorescència en **verd**.
 3. **DAPI** – excita amb ultraviolada i emet amb **blau** (també per Hoechst).
 - 4, 5,6 – sense filtres
- Direcció del pas de la llum: haurem d'anar prement les diferents opcions (a, b, c...) en funció de si estem observant la mostra amb el microscopi o amb l'ordinador. En el nostre cas, premerem (**a**) quan estiguem mirant la mostra amb els **oculars** i premerem (**b**) quan estiguem mirant amb la **càmera**, és a dir, a l'ordinador (perquè b és visió amb càmera Hamamatsu de fluorescència).



Una altra part important del microscopi de fluorescència són els **filtres ND**, que controlen la intensitat de llum que irradia la mostra. Hi ha dos filtres que estan situats a la banda dreta del microscopi: **ND4 i ND8** i redueixen la quantitat de llum 1/4 i 1/8 respectivament. Es poden utilitzar sols o conjuntament. A nosaltres ens interessa no tocar els filtres perquè poden desgastar molt la fluorescència de la mostra.



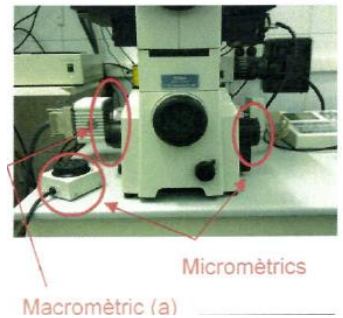
2.3. Visualització de la mostra

Un cop havet encès tots els components necessaris, els passos a seguir són:

- 1) Ajustar els oculars: aproximar/separar els oculars en funció de la nostra distància interpupil·lar.
- 2) Posar la mostra a la platina.
- 3) Triar el tipus d'observació a realitzar: en el nostre cas fluorescència.
- 4) Selecciona els objectius: 20X
 - Busca la zona d'observació amb un objectiu de pocs augment començant amb els objectius en posició baixa.

- El moviment del revòlver es realitza des de la consola (objective) → NO moure mai els objectius manualment!

- 5) Enfocar la mostra: l'enfocament de la mostra pot realitzar-se mitjançant el **macromètric**, situat en el lateral esquerre del microscopi i posteriorment, fer l'ajustament fi amb el **micromètric**. Hi ha dos micromètrics: el del microscopi i el del controlador remot T-RCP. L'activació d'un o l'altre es fa pel botó del micromètric auxiliar mòbil en ON/OFF.
- 6) Pel moviment pels diferents camps utilitzarem el **joystic** (eixos x,y).



2.4. Programa d'ordinador

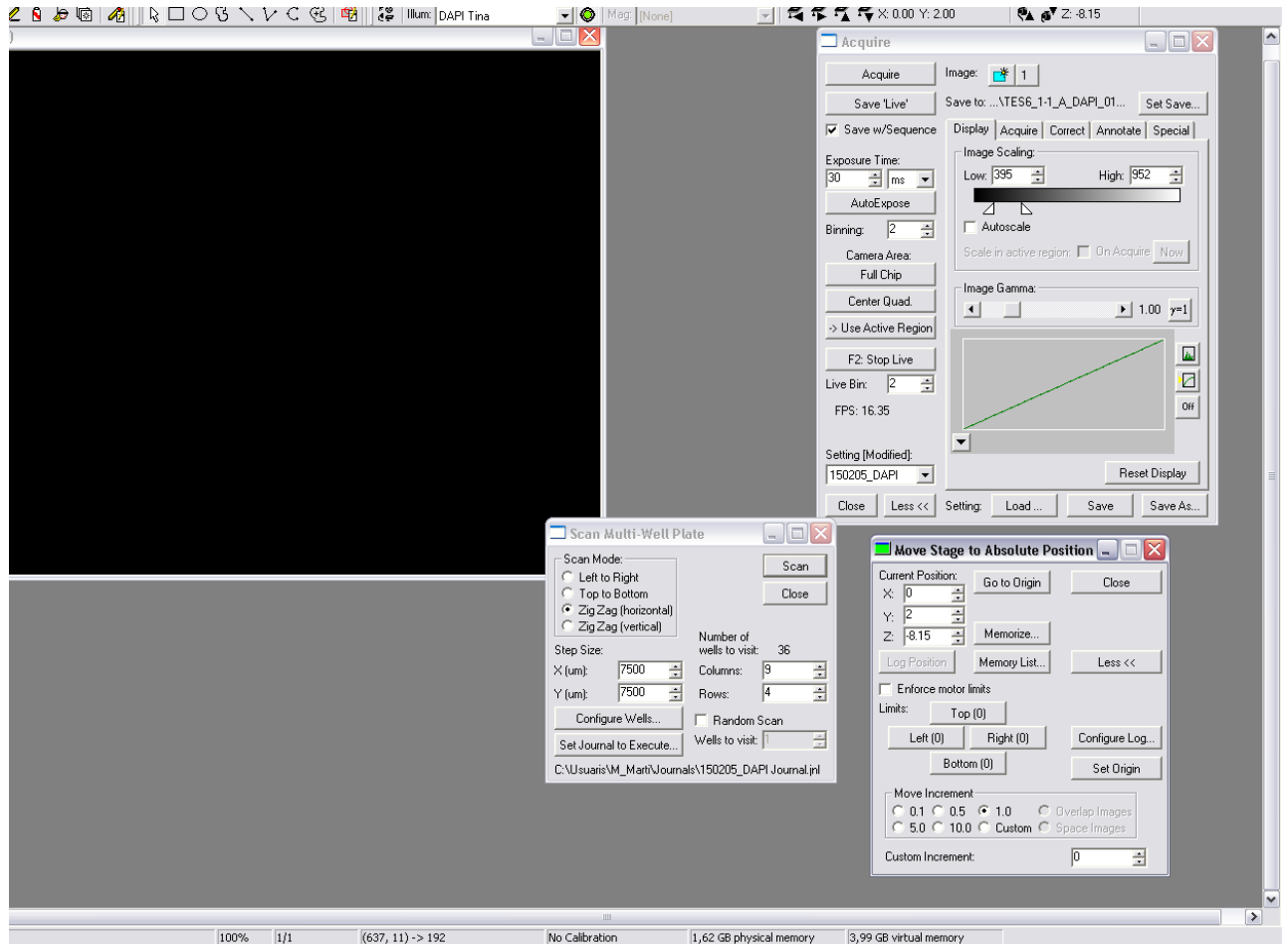
El software que utilitzem per visualitzar les mostres és el **MetaMorph**. Per treballar amb el programa, sempre tindrem tres finestres obertes:

- 1- Un cop l'hem encès, el primer que hem de fer és clicar a Acquire → Acquire i ens apareixerà una finestra.
- 2- Cliquem Device → Stage → Move stage to absolute position.
- 3- Obrim també Device → Stage → Scan Multi-well plate.

Fotografiar amb DAPI

- 1- Comprovar que estigui seleccionada l'opció DAPI a "llum" i a la finestra Acquire→Setting.
- 2- A través de Set Save a la finestra Acquire, seleccionar el directori i donar nom a les fotos ("Nom de la mostra_nº porta-nº tall_hemisferi_DAPI_01", sempre acabar amb 01 ja que el nom correspondrà a la primera foto, exemple: TES7_1-1_A_DAPI_01).
- 3- Afegir el Journal a Scan Multi-well plate: DAPI journal en aquest cas.
- 4- Obrir el Shutter i clicar Show live (assegurar-se que al microscopi està activada la càmera de l'esquerra).
- 5- Enfocar, ajustar la fluorescència, seleccionar "12" en el símbol de la balança de l'esquerra i seleccionar el color blau. Procurar que les cèl·lules es puguin veure amb claredat i no "cremades". Clicar Save a la part d'abaix de la finestra Acquire per guardar les modificacions del DAPI.
- 6- A la finestra Move Stage to absolute Position → Establir origen (normalment a l'inici del tall) clicant Set Origin. Buscar la X al límit contrari de l'origen i la Y més elevada i més inferior si es necessari. Anotar les dades al document Excel per obtenir el nº de columnes i files.
- 7- A l'hora de decidir el nº de files i columnes afegim un números més (ex: 2,07 → 3 columnes). Quan el número passi de .50 afegirem dos nombres més (ex: 2,55 → 4 columnes)

- 8- A la finestra Scan Multi-well plate afegim el nº de columnes i files i a Configure wells comprovem que estan seleccionades totes les fotos a fer. Comprovar que està seleccionat: Zig Zag (horitzontal)
- 9- S'apaga el shutter i es clica Stop live a la finestra Acquire.
- 10- Posar-hi les coordenades X i Y d'inici de l'escaneig.
- 11- Apretar SCAN (un cop comença no es pot cancel·lar fins que es fan totes les fotos).



Fotografiar amb BrdU

- 1- Com ja estan guardades les preferències del DAPI (Origin), les coordenades són les mateixes.
- 2- Seleccionem BrdU a "llum" i a "setting" així com haurem de seleccionar el journal BrdU a Scan.
- 3- Canviem el directori a Set Save i també el nom (TES7_1-1_A_BrdU_01).
- 4- Obrir shutter i Show live per comprovar l'enfoc (posar en color verd però NO guardar les preferències (SAVE) de BrdU).
- 5- A la finestra Scan Multi-well plate afegim el nº de columnes i files (les mateixes que hem posat a DAPI i estan guardades al document excel)
- 6- S'apaga el shutter i es clica Stop live a la finestra Acquire.
- 7- Posar-hi les coordenades X i Y d'inici de l'escaneig.
- 8- Apretar SCAN (un cop comença no es pot cancel·lar fins que es fan totes les fotos).

Fer el mosaic d'imatges amb ImageJ

Per tal de fer el mosaic amb les fotografies farem servir el programa ImageJ. El podem trobar a la carpeta de C-Barcia →Fiji

- 1- Un cop obert el programa, cliquem Pluggins→Stitching. Seleccionem Type: Snake by rows i Left Up.
- 2- A Grid size X→ N° de columnes Grid size Y→n° de files
- 3- A first file 01...
- 4- Seleccionem carpeta a Browse.
- 5- Afegim un nom per el futur mosaic (ex; TES7_1-1_A_BrdU_fused, **sempre format tiff.**)

Anexo 2: Protocolo sobre el uso de Image J

Després de la captura amb el microscopi, el que obtenim és un conjunt de fotografies de les diferents regions del hipocamp (veure protocol ús del microscopi) que s'han d'unir per obtenir un mosaic de la zona sencera.

L'Image J, es un programa de Fiji, que permet fer aquest muntatge. El programa es pot descarregar de forma gratuïta des del següent link:

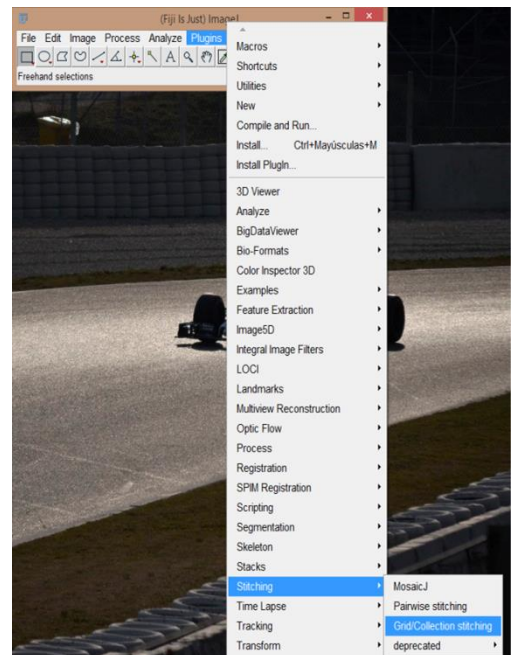
- <http://fiji.sc/Fiji>

A) COM FER EL MOSAIC

Un cop instal·lat el programa, s'ha de realitzar el mosaic. Per aconseguir-ho, hem de:

1. Obrim el programa i a la part superior cliquem l'opció de Plugins, entrem al submenú de stitching i escollim la opció Grid/collection stitching

Plugins → Stitchin → Grid/Collection stitching

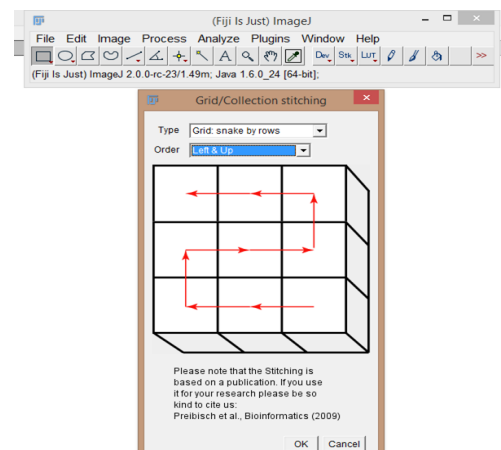


2. Un cop s'ha obert la finestra de Grid/Collection hem de de configurar les característiques del mosaic. En el nostre cas haurem de seleccionar l'opció:

Type → Grid: snake by rows.

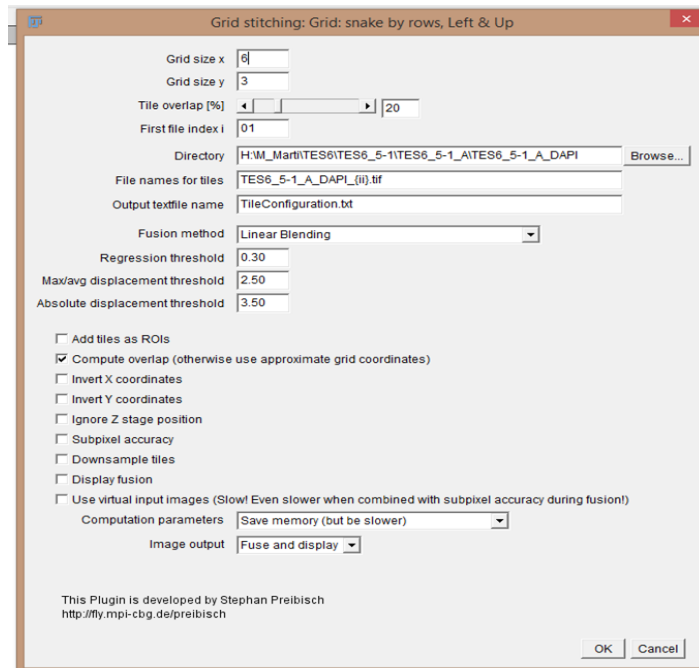
Order → Left & up

→ I li donem a OK



3. Ens apareixerà una finestra on haurem de determinar:
 - a) El nombre de columnes i files (mirar l'excel amb les coordenades).
A **Grid sixe X** determinarem el nombre de files
A **Grid sixe Y** determinarem el nombre de columnes.
 - b) Quina és la primera imatge del mosaic
First File Index i → 01

- c) El següent pas es indicar on estan les imatges.
Directory → Browse → Seleccionar la carpeta.
- d) **Files names for tiles: Posar el nom de la carpeta + $_{{ii}}$.tif**
Exemple: TES6_5-1_A_DAPI_{{ii}}.



La resta de opcions es deixem com venen predeterminades.

- e) Marquem l'opció: **OK**

4. Sortirà la imatge en pantalla (si no és així revisar el nom de la carpeta i arxiu!!!!).
Ara ja podem canviar les condicions de contrast i lluminositat i ajustar-les al mosaic. Hem d'anar a Image, clicar adjust i entrar al submenú de Brightness/contrast:

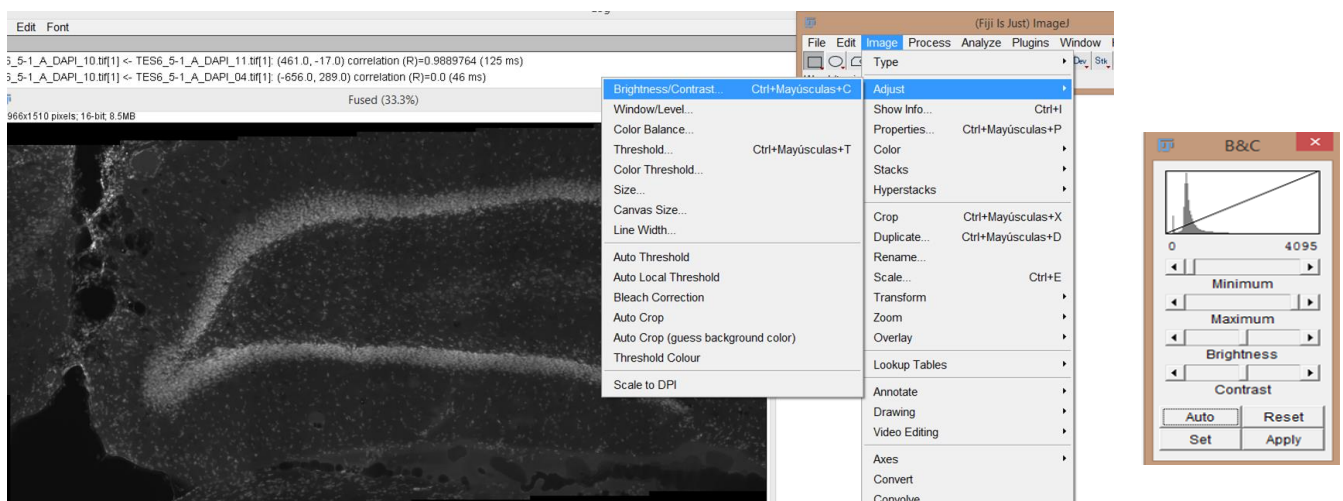
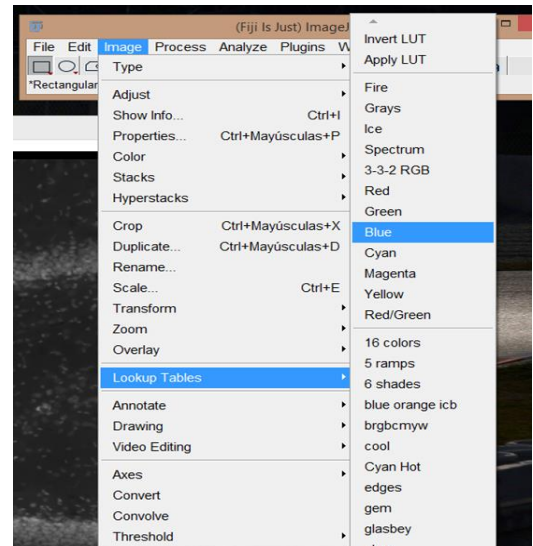


Image → Adjust → Brightness/contrast.

5. Modifiquem el color de la imatge.

PER A DAPI: **Image → Look up tables → Blue**

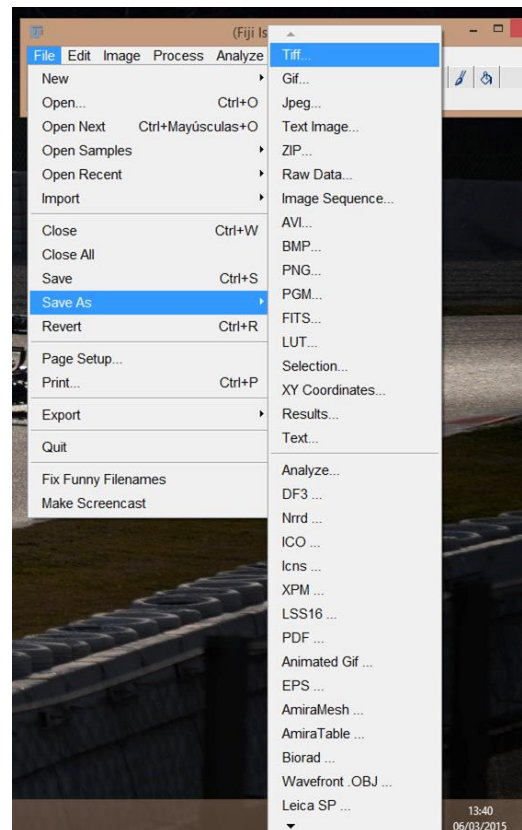
PER A BrdU: **Image → Look up tables → Green**



5. Un cop ajustades les condicions, guardem la imatge.

File → Save As → Tiff.... → Seleccionem la carpeta i posem el nom (Ex: *TES6_5-1_A_DAPI_Fused*).

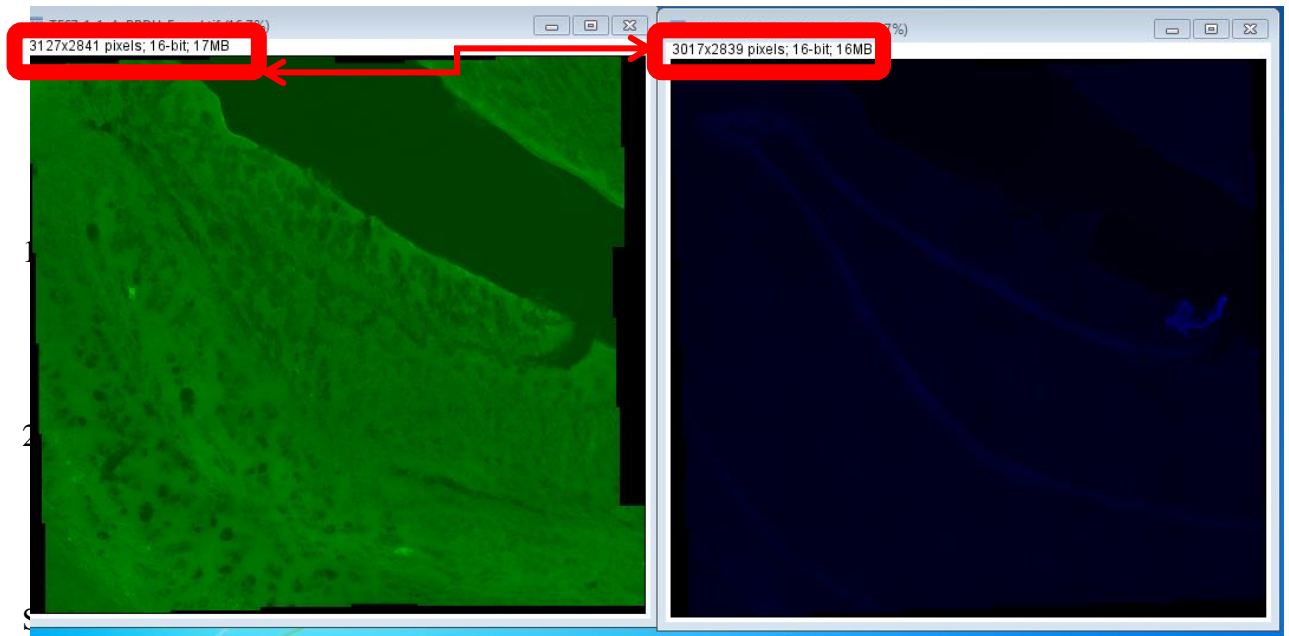
➔ **ATENCIÓ!!!!** Estem guardant l'arxiu en format Tiff. Amb aquest format podrem modificar la fotografia sempre que vulguem amb l'ImageJ. Si la volem veure al ordinador o utilitzar-la en un altre programa l'hauréu de guardar com a Jpeg. Per a poder guardar-la en aquest format, haurem de: **File → Save As → Jpeg.... → Seleccionem la carpeta i posem el nom**



B) AJUSTAR LES FOTOGRAFIES DE DAPI/BrdU D'UNA MATEIXA REGIÓ.

Aquest pas NOMÈS és necessari fer-ho quan les fotografies de DAPI i BrdU tenen diferent tamany.

Per saber-ho, haurem de fixar-nos en els píxels de la imatge.



3. Anem a l'altra fotografia i també la seleccionem.

Edit → Selection → Select all

A la finestra de Roi Manager oberta, li donem a Add.

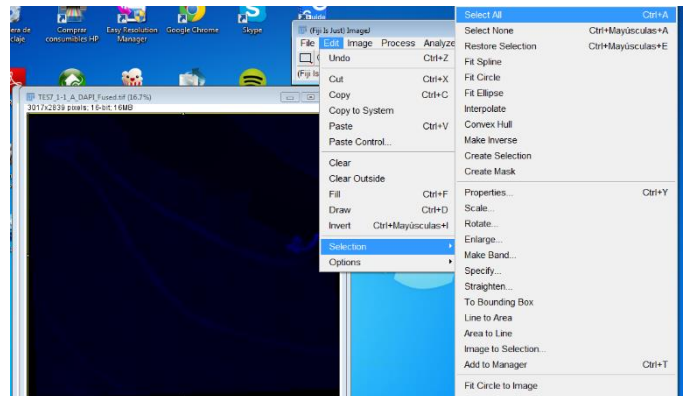
Roi Manager → Add

4. Ara a la finestra de ROI Manager ens surten les dues imatges.

Deixem oberta aquesta última fotografia (la que té un major nombre de píxels)

però a la finestra de ROI manager

cliquem la primera (la que tenia menys píxels i la primera que surt a la llista del ROI).



5. Ajustem el tamany de la primera foto a la segona. La línia groga que selecciona la imatge ha de coincidir amb la primera.

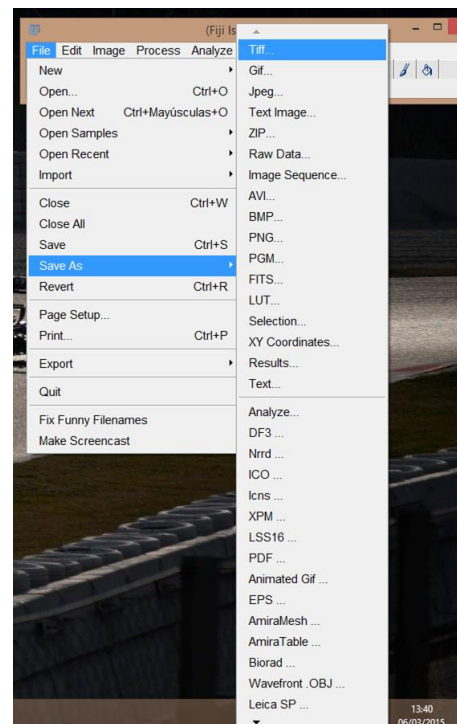
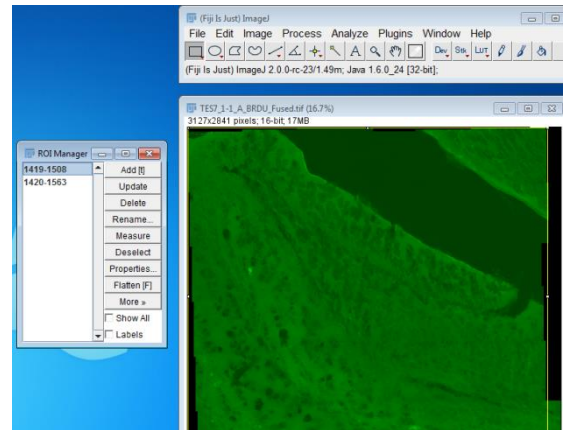
Image → Duplicate → OK

Sortirà la foto més gran amb els mateixos píxels que la que en tenia menys píxels. Les dues fotos tindran el mateix tamany.

6. Guardem la imatge.
File → Save As → Tiff.... → Seleccionem la carpeta i posem el nom (Ex: *TES6_5-1_A_DAPI_Fused*).

→ *Recordar que ho estem guardant en format Tiff, i podrem modificar la imatge amb l'ImageJ.*

Per guardar-la com Jpeg haurem de: **File → Save As → Jpeg.... → Seleccionem la carpeta i posem el nom**



C) MUNTATGE DAPI/Brdu

1. **Image → Color → Merge channels**
Al **C2 (green)** seleccionem la fotografia de **Brdu**.

Al **C3 (blue)** seleccionem la fotografia de **DAPI**.

La resta de canals els deixem en l'opció ***None***.

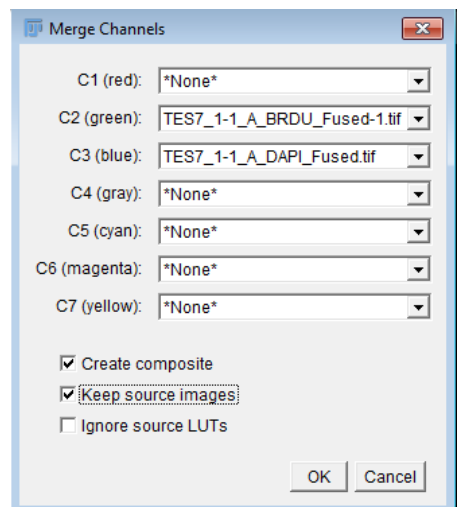
Cliquem l'opció Create composite
Cliquem l'opció Keep source images.

Aquesta opció permetrà mantenir les dues imatges sense que es sobreescriguin.

→ **Un cop hem acabat, clickem OK**

7. Ara tenim les imatges de Brdu i DAPI unificades en una mateixa fotografia. Per poder fer el comptatge de neurones, haurem de treure i posar un canal.

Image → color → channels tools



8. Guardem la imatge.
File → Save As → Tiff.... → Seleccionem la carpeta i posem el nom (Ex: *TES6_5-1_A_DAPI_Merged*).
- ➔ *Recordar que ho estem guardant en format Tiff, i podrem modificar la imatge amb l'ImageJ. Si la necessitem per un altre programa o la volem veure l'haurem de guardar com a Jpeg.*
Per a poder guardar-la en aquest format, haurem de: **File → Save As → Jpeg.... → Seleccionem la carpeta i posem el nom.**

**EFFECTOS DE LA D-CICLOSERINA EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL
EN RATAS ENVEJECIDAS: RELACIÓN CON LAS FUNCIONES
COGNITIVAS.**

Resumen ejecutivo 1

**EFFECTOS DE LA D-CICLOSERINA EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL
EN RATAS ENVEJECIDAS: RELACIÓN CON LAS FUNCIONES
COGNITIVAS.**

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas afectan a más del 50% de la población mayor de 85 años y el deterioro cognitivo durante el envejecimiento es un tema de relevancia en una sociedad que aumenta progresivamente su porcentaje de población anciana. Este deterioro es irreversible y puede suponer desde pequeños problemas en la capacidad de adaptación a los cambios del entorno a importantes alteraciones en las actividades cotidianas que pueden llegar a considerarse como enfermedad neurodegenerativa leve o grave. El creciente interés por este tema ha potenciado la realización de numerosas investigaciones sobre los mecanismos biológicos involucrados en el envejecimiento cerebral y su relación con la pérdida de funciones cognitivas. No obstante, aún no existen resultados que permitan explicar íntegramente las causas de este deterioro y el conocimiento de los factores de prevención o atenuación de los mismos son limitados.

En numerosos estudios se han observado cambios a nivel del sistema nervioso central (SNC) en la vejez que se relacionan con la pérdida de las funciones cognitivas, especialmente del aprendizaje y la memoria. (Samson & Barnes, 2013). Algunos de estos estudios han mostrado una reducción progresiva y natural del número de nuevas células (neurogénesis) en el hipocampo (HPC), estructura clave en los procesos cognitivos (Jurd, 2011), durante el envejecimiento. La neurogénesis en el HPC se ha relacionado con la plasticidad sináptica y es muy activa durante el desarrollo del cerebro pero en la adultez desciende de forma relevante (Cameron & Glover, 2015). La relación entre el HPC y los procesos mnemónicos sugiere que la generación de nuevas neuronas en animales adultos y envejecidos podría ser clave para el mantenimiento óptimo de los procesos de aprendizaje y memoria.

La d-cicloserina (DCS) es una sustancia antibiótica utilizada principalmente contra la bacteria de la tuberculosis. No obstante, se ha comprobado que actúa como un agonista parcial de los receptores N-metil-D-aspartato(NMDA) del glutamato, un importante neurotransmisor del SNC relacionado con el aprendizaje y la memoria. Esto ha supuesto que en los últimos años se hayan hecho estudios para evaluar la capacidad de la DCS como potenciador de los procesos de aprendizaje de la extinción del miedo en humanos y como procedimiento complementario para el tratamiento de trastornos de ansiedad (Hofmann, Meuret, Smits, Simon, Pollack & Eisenmenger 2006; Ressler, Rothbaum, Tannenbaum, Anderson, Graap & Zimand, 2004). Asimismo, otros estudios han encontrado evidencias de que la inyección intra-hipocampal de DCS facilita el aprendizaje espacial dependiente del HPC en ratas envejecidas (Baxter, Lanthorn, Frick, Golski, Wan & Olton, 1994; Aura, Riekkinen & Riekkinen, 1998; Aura & Riekkinen, 2000).

Teniendo en cuenta la posible relación entre la neurogénesis y los procesos mnemónicos y la capacidad de la DSC para potenciar la adquisición y el recuerdo de tareas de tipo espacial dependientes del HPC, nuestro trabajo consistió en el estudio de los posibles efectos beneficiosos de la DCS inyectada en el HPC sobre la tasa de neurogénesis del GD de ratas envejecidas y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria.

Los objetivos concretos que planteados fueron:

1. Confirmar que la neurogénesis en el GD de las ratas viejas es menor que la de las ratas jóvenes.
2. Estudiar si la DCS inyectada en el HPC de ratas envejecidas promueve la supervivencia de nuevas células en comparación con las ratas no tratadas.

Este proyecto va dirigido, por un lado, a institutos de neurociencias interesados en el estudio del deterioro cognitivo durante el envejecimiento así como en la investigación de nuevos factores que permitan su atenuación y/o prevención. Por otro lado, también va dirigido a aquellas fundaciones dedicadas a la ayuda en la investigación de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer que estén interesadas en financiar la investigación de nuevos factores de prevención y/o tratamientos que puedan retrasar su aparición. Este estudio muestra algunas consecuencias neurobiológicas que conlleva el envejecimiento así como una nueva propuesta de tratamiento que, pese a no presentar resultados significativos, puede suponer un punto de partida en la búsqueda de nuevos recursos que

prevengan o atenúen el declive de las funciones cognitivas y permitir una correcta adaptación al entorno también en la vejez.

Metodología

Para la realización del estudio se contó con una muestra de 22 ratas de la cepa *Rattus norvegicus*, divididas según su edad (jóvenes o viejas). Todos los sujetos realizaron dos tareas de aprendizaje: la transmisión social de preferencias alimentarias (TSPA) y el laberinto acuático de Morris (LAM), ambas tareas de tipo relacional dependientes del HPC. A la mitad de cada grupo de edad se le inyectó DCS (grupo experimental) y a la otra mitad tampón fosfato salino (PBS) (grupo control) 20 minutos antes de la tarea TSPA y de cada una de las 5 sesiones del LAM. En la semana sin entrenamiento entre tareas se realizó la administración de Bromodesoxiuridina (BrdU), un nucleótido sintético análogo a la timina que actúa como un marcador de nuevas células durante el periodo en que se administra la sustancia. Las 22 ratas fueron sacrificadas a los 21 días de la inyección de BrdU.

Para estudiar la supervivencia de nuevas células en el GD del HPC, se realizó la inmunohistoquímica para la BrdU. Este proceso permite hacer visibles en el microscopio todas las células del GD mediante DAPI (marcador fluorescente) y las nuevas células marcadas con BrdU mediante la unión de un anticuerpo primario y uno secundario fluorescente. Una vez terminada la inmunohistoquímica, se realizó el montaje de las muestras en portaobjetos (Figura 1). Estas se conservan en nevera y protegidas de la luz directa para evitar la pérdida de la fluorescencia.

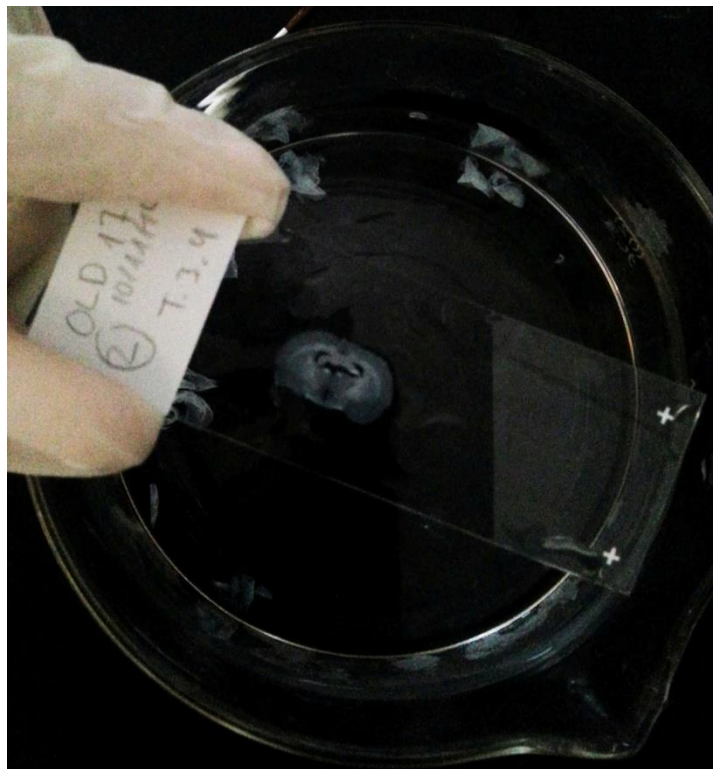
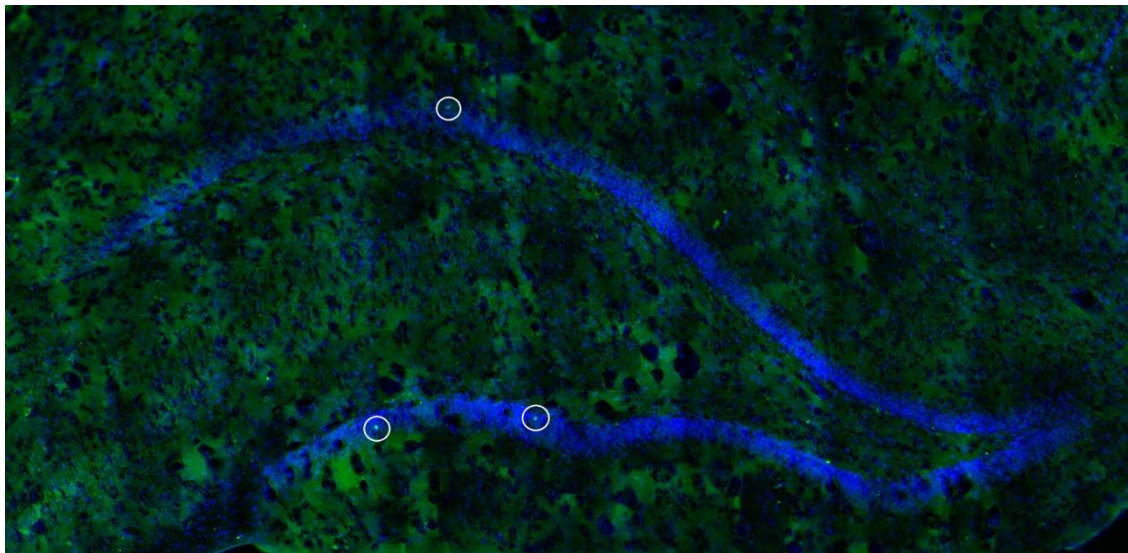


Figura 1: Montaje de los cortes coronales en los portas.

Se realizó el proceso de fotografía con el Microscopio Óptico de Epifluorescencia Nikon TE2000e de la Facultad de Medicina de la UAB. Mediante el programa MetaMorph se adquirieron las imágenes de los GD de cada muestra, tanto con el filtro para BrdU como para DAPI, que posteriormente se unificaron en mosaicos con el programa ImageJ (Figura 2). Este programa también permitió la cuantificación manual de las nuevas células



marcadas con BrdU según unos criterios establecidos de tamaño, forma y fluorescencia que coincidieran con células marcadas con DAPI. Finalmente se seleccionaron 6 cortes de GD por sujeto para la cuantificación, y se analizaron un total de 132 muestras.

Una vez obtenido el número de nuevas células por cada sujeto, se llevó a cabo el análisis estadístico descriptivo y comparativo mediante el programa IBM SPSS Statistics 22.0.

Resultados

Los resultados obtenidos con el ANOVA de dos vías mostraron diferencias significativas ($F_{1,20}=26,894$, $p<0.001$) entre el número de nuevas células en ratas jóvenes y viejas mostrando las primeras un número mucho mayor de células marcadas ($\bar{x}=66.00$ y $\bar{x}=24.00$, respectivamente), coincidiendo con los resultados de otros estudios previos. En cuanto al efecto de la DCS sobre la neurogénesis, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($F_{1,20}=0.351$, $p=0.561$) entre el grupo experimental (ratas con DCS, $\bar{x}=49.09$) y el control (ratas con PBS, $\bar{x}=42.60$). Por otro lado, los resultados Figura 2: Mosaico del GD de una rata joven con los dos canales (DAPI y BrdU) y sus nuevas células marcadas con fluorescencia.

determinaron que no existe interacción entre la edad y el tratamiento ($F_{1,20}=0.351$, $P=0.561$), el grupo de ratas viejas con DCS no mostró una mayor supervivencia celular

en el GD. Estos resultados nos llevan a la conclusión que la DCS no evitó el declive en la supervivencia celular que se observa normalmente en el envejecimiento.

Consideraciones e implicaciones

Los resultados obtenidos sugieren que el envejecimiento de las ratas supone una disminución significativa de la supervivencia de nuevas células en el GD en comparación con edades más tempranas. Nuestros resultados coinciden con investigaciones previas que demuestran que este declive empieza entre los uno y dos meses de edad y continua de manera progresiva con el paso del tiempo (Lee, Clemenson & Gage, 2012). Por lo tanto, estos resultados añadidos a los que muestran que una baja tasa de neurogénesis en ratas adultas afecta al rendimiento en tareas de aprendizaje como el LAM (Wojtowicz, Askew & Winocur, 2008), demuestran la relevancia de la neurogénesis en el deterioro de las funciones cognitivas, principalmente la memoria y el aprendizaje, en relación con el envejecimiento destacando así la importancia de su estudio en profundidad y su posible potenciación.

En este sentido, nuestro trabajo se centró también en los posibles efectos de la DCS sobre la potenciación de la neurogénesis. No obstante, los resultados obtenidos no fueron significativos ya que las ratas viejas a las que les fue suministrada DCS no mostraron una mayor supervivencia de células en el GD que fuera estadísticamente relevante. Esto sugiere que la DCS no aumenta el número de células nuevas en el HPC de las ratas viejas. Nuestros resultados no concuerdan con investigaciones en los que se observó un incremento de la neurogénesis después de la administración de DCS (Sultan, Gebara, Moullec & Toni, 2013). Sin embargo, hay algunos aspectos metodológicos que podrían explicar la falta de resultados positivos. En nuestro trabajo no hubo contingencia entre la inyección de DCS y la del marcador BrdU. Esta coincidencia podría ser crítica para evaluar los efectos de la DCS en la neurogénesis. Por otro lado, algunas investigaciones muestran que el estudio de la proliferación en lugar de la supervivencia celular podría ser más interesante para obtener resultados concluyentes sobre la neurogénesis durante el envejecimiento (Epp, Haack & Galea, 2011).

Con todo, el hecho de que la DSC haya sido capaz de mejorar la memoria de las ratas envejecidas (Baxter, Lanthorn, Frick, Golski, Wan, & Olton, 1994) sugiere que otros mecanismos neurobiológicos, además de la neurogénesis, podrían contribuir también a sus efectos positivos. En resumen, nuestro trabajo es sólo un primer paso en el estudio de mecanismos neurobiológicos relacionados con la potenciación cognitiva durante el

envejecimiento y con él se abren nuevas posibilidades para futuras investigaciones. El desarrollo en profundidad de este estudio podría suponer a la larga el desarrollo de tratamientos en personas pioneros en la prevención y/o atenuación del proceso de deterioro cognitivo natural o resultado de las enfermedades neurodegenerativas. El estudio del declive cognitivo que acompaña el envejecimiento y de sus posibles factores de prevención se han convertido en temas de vanguardia en nuestra sociedad ya que supone una importante afectación para la calidad de vida de un porcentaje cada vez más alto de la población.

RESUMEN EJECUTIVO 2

EFFECTOS DE LA D-CICLOSERINA EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL EN RATAS ENVEJECIDAS: RELACIÓN CON LAS FUNCIONES COGNITIVAS.

Introducción

En las últimas décadas, el incremento de la esperanza de vida ha dado lugar a un aumento en el número de personas que padece deterioro cognitivo, ya que el envejecimiento cerebral supone un factor de riesgo de padecer demencias y se estima que un 50% de los adultos con más de 85 años padece Alzheimer (Bishop & Yankner, 2010). El aumento de las enfermedades que se acompañan con problemas de memoria y aprendizaje ha motivado a los investigadores a estudiar los mecanismos biológicos involucrados en el envejecimiento cerebral y su relación con la pérdida de funciones cognitivas.

Se ha observado que durante el envejecimiento se produce una serie de cambios en el cerebro como son: disminución de la sustancia blanca, especialmente del córtex prefrontal y el cuerpo calloso, atrofia y reducción del volumen cerebral y la afectación de estructuras del lóbulo temporal medial como el hipocampo (HPC) (Yankner, Lu & Loerch, 2008). Estos cambios conllevan un deterioro de las funciones cognitivas, especialmente de la memoria y la velocidad de procesamiento (Samson & Barnes, 2013). También, se ha observado que con la edad se produce una reducción de la neurogénesis en el HPC. La neurogénesis es el proceso de proliferación y desarrollo de nuevas neuronas y células gliales en el SNC. En la edad adulta, este proceso se da de forma localizada en regiones como el bulbo olfatorio y el giro dentado (GD) del HPC (Drew, Fusi & Hen, 2013; Lee, Clemenson & Gage, 2012). La estimulación de las neuronas de esta área induce a la

potenciación a largo plazo (PLP), fenómeno que consiste en un aumento a largo plazo de la excitabilidad de una neurona ante determinados impulsos sinápticos debido a una actividad recurrente y de alta frecuencia. La PLP es un factor esencial en el aprendizaje y la memoria (Nabavi, Proloux, Lin, Tsien & Malinow, 2014).

En los últimos años ha adquirido una especial relevancia el estudio de factores que podrían actuar como protectores del declive cognitivo que se observa durante el envejecimiento como la restricción calórica, el ejercicio físico y fármacos como la D-cicloserina (DCS). La DCS es una sustancia antibiótica utilizada contra la bacteria de la tuberculosis. En el cerebro actúa como un agonista parcial de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato ya que funciona uniéndose a estos en el lugar de la glicina facilitando su activación. Por otro lado, se ha observado en animales jóvenes que la DCS potencia la neurogénesis hipocámpal que también se relaciona con procesos de memoria y plasticidad sináptica (Ren, Li, Zhang, Wang & Ma, 2013). En un estudio en el que se examinaba los efectos conductuales de administrar dicha sustancia a un grupo de ratas viejas (24 meses de edad) y a un grupo de ratas jóvenes (4 meses de edad), se observó que aquellas ratas a las que se les suministraba DCS mostraban un mejor rendimiento en el Laberinto Acuático de Morris, en comparación con el grupo control (Baxter, Lanthorn, Frick, Golski, Wan & Olton, 1994). Estos resultados han sido confirmados por trabajos posteriores en los que se observó que la DCS mejoraba la adquisición de una tarea de navegación en ratas adultas (Aura, Riekkinen & Riekkinen, 1998; Aura & Riekkinen, 2000).

En este contexto podemos sugerir que la DCS podría facilitar los procesos cognitivos mediante la potenciación de la neurogénesis hipocámpal y en consecuencia disminuir los efectos del deterioro cognitivo que acompaña el envejecimiento normal o patológico, como sucede en la enfermedad de Alzheimer.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar los posibles efectos beneficiosos de la DCS inyectada en el HPC en la neurogénesis del giro dentado (GD) de ratas envejecidas. La hipótesis de partida del estudio fue “la potenciación de la transmisión glutamatérgica en el HPC mediante la estimulación de los receptores NMDA mejora las funciones cognitivas durante el envejecimiento, potenciando la neurogénesis en edades avanzadas”.

Los objetivos específicos del estudio fueron:

1. Confirmar que la generación de nuevas neuronas en ratas viejas es menor que la de las ratas jóvenes.
2. Estudiar si la DCS inyectada en el HPC de ratas envejecidas promueve la supervivencia de nuevas células en comparación con las ratas no tratadas.

Este proyecto va dirigido, por un lado, a todas aquellas instituciones interesadas en la investigación del envejecimiento cerebral y la neurogénesis hipocampal y también a aquellas instituciones sanitarias y clínicas interesadas en la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, ya que la administración de la DCS podría suponer un posible tratamiento para el deterioro cognitivo.

Metodología

La muestra estaba formada por un total de 22 ratas de la cepa *Rattus norvegicus* divididas en dos grupos según su edad: 12 ratas jóvenes (3-4 meses de edad) y 10 ratas viejas (22-24 meses de edad). Dentro de cada grupo de edad encontramos ratas a las que se les inyectó DCS (grupo experimental) o tampón fosfato salino (PBS) (grupo control). Las ratas fueron entrenadas en tareas de aprendizaje hipocampo dependientes como el laberinto acuático de Morris (LAM) o la transmisión social de preferencias alimentarias (TSPA). En la semana de descanso entre las dos tareas se administró la bromodesoxiuridina (BrdU). La BrdU es un antígeno que funciona como marcador de nuevas células. Las ratas fueron sacrificadas a los 21 días de la primera inyección lo que nos permitió estudiar supervivencia celular. En primer lugar se realizó una inmunohistoquímica para BrdU que permitió la detección de nuevas células en el microscopio y posteriormente se fotografió el giro dentado en el microscopio. En nuestro caso, se fotografió dos veces la misma sección: primero con el canal de DAPI, que permite ver los cuerpos celulares del GD, y seguidamente con el de BrdU, donde se observa aquellos nuevos cuerpos celulares que han sobrevivido después de la inyección de DCS. Posteriormente, se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital Image J para unir las fotografías y realizar los montajes de cada GD (Figura 1). Se seleccionaron 6 cortes de GD por sujeto para la cuantificación, y se analizaron un total de 132 muestras. En primer lugar, se examinaba la fotografía del canal de BrdU en el que se detectaba

posibles células y mediante la fotografía del canal de DAPI se confirmaba si se trataba de un cuerpo celular.

Después de realizar la cuantificación se llevó a cabo un análisis descriptivo y comparativo

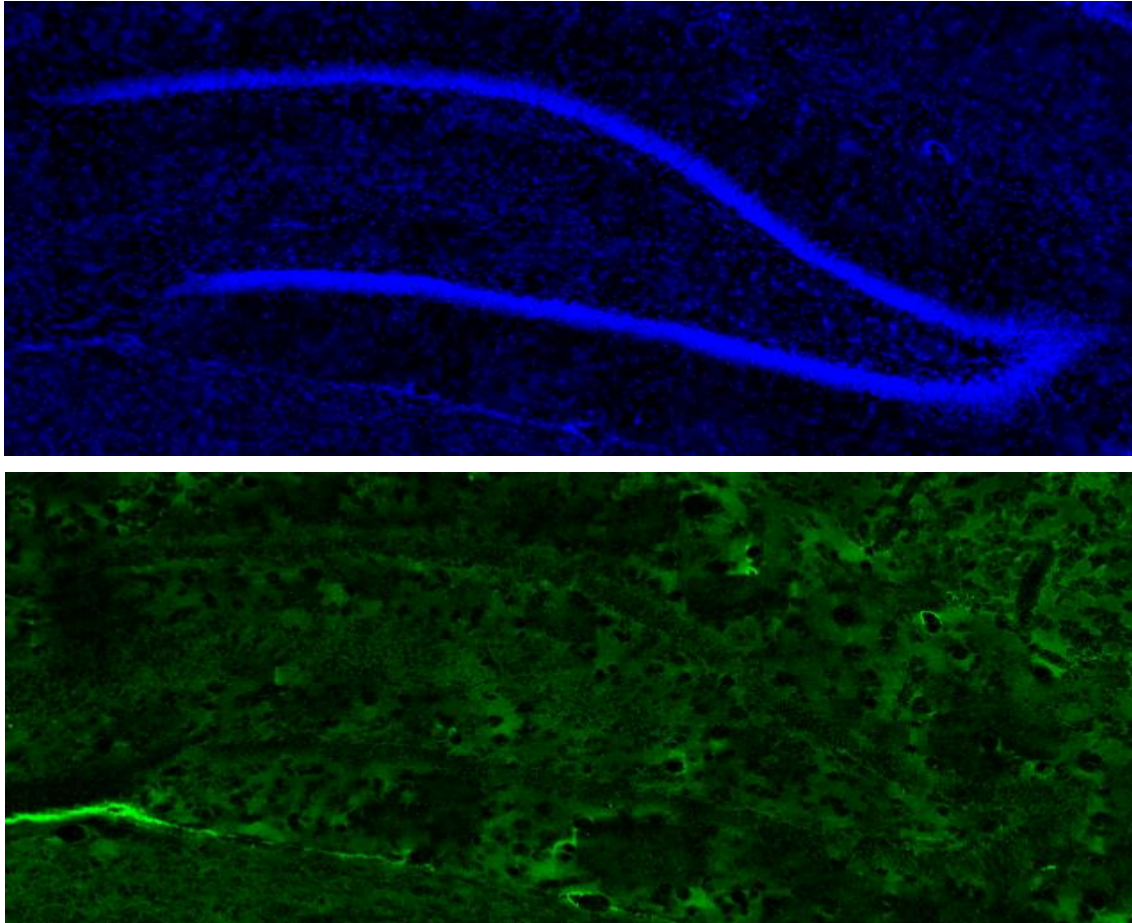


Figura 1: Fotografías de un GD de rata joven con los dos canales de fluorescencia (DAPI y BrdU). En la imagen superior se muestra la fotografía realizada con el filtro de DAPI y en la inferior de BrdU.

mediante el programa IBM SPSS Statistics 22.0. Por lo tanto:

- Se realizó un análisis de la variancia (ANOVA de dos vías) para estudiar la comparación de medias entre grupos, en la que se presenta el número de nuevas células como variable dependiente y el factor edad (ratas jóvenes y envejecidas) y la droga (inyección de DCS o PBS) como variables independientes.
- La comparación de medias entre grupos mediante un ANOVA de una vía distinguiendo los cuatro grupos: ratas jóvenes con PBS, ratas jóvenes con DCS, ratas viejas con PBS y ratas viejas con DCS.

Resultados

Los resultados obtenidos mostraron que el número de células nuevas era mayor en ratas jóvenes ($\bar{x} = 66.00$) que en las ratas viejas ($\bar{x} = 24.00$); esta diferencia fue estadísticamente significativa tal como se confirmó con el análisis de la variancia de dos vías ($F_{1,20}=26,894$, $p<0.001$). Por otro lado, el análisis estadístico no mostró efectos de la DCS ya que la media del número total de nuevas células en ratas con DCS ($\bar{x}=49.09$) no fue estadísticamente diferente ($F_{1,20}=0.351$, $P=0.561$) respecto al grupo con PBS ($\bar{x}=42.60$). El ANOVA de una vía distinguiendo cuatro grupos: ratas jóvenes con PBS, jóvenes con DCS, viejas con PBS y viejas con DCS obtuvo los mismos resultados que el análisis de dos vías de factores (edad y tratamiento). La media para las ratas jóvenes con PBS y DCS ($\bar{x}=66.00$ y $SD=22.847$; $\bar{x}=66.00$ y $SD=20.435$, respectivamente) fue superior a los grupos de ratas viejas PBS y DCS ($\bar{x}=19.20$ y $SD= 7.823$; $\bar{x}=28.80$ y $SD= 18.687$) (figura 2).

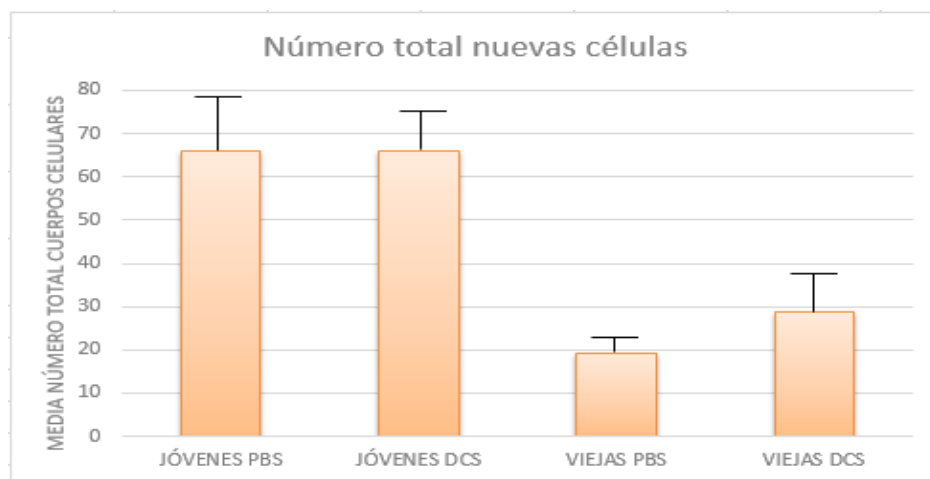


Figura 2: Gráfico de barras que muestra la media del número de nuevas células encontradas junto con el error estándar en los 4 grupos del estudio.

Consideraciones e implicaciones

En primer lugar, en concordancia con los trabajos anteriores, encontramos que la supervivencia celular en el HPC en ratas viejas es significativamente menor en comparación al grupo de ratas jóvenes. En segundo lugar, aunque el grupo de ratas viejas, a los que se les administró la DCS presentaron un mayor número de cuerpos celulares que el grupo control, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Por lo tanto, parece que la DCS no detiene la disminución de la supervivencia celular que se produce con la edad.

La discrepancia de resultados podría explicarse en parte por el hecho de que en nuestro estudio la BrdU no sea administró de forma contingente a la DCS, y por lo tanto no es posible valorar si hubo un efecto derivado de la administración de la sustancia intracerebral. Si se siguiera con esta línea de investigación sería necesario estudiar la supervivencia celular administrando la DCS y la BrdU de manera concurrente. Además sería necesario utilizar un doble marcaje (BrdU y el marcador Neu-N) para asegurarnos de que los cuerpos celulares detectados son neuronas y no células gliales.

Así pues, los resultados obtenidos en este estudio no permiten establecer conclusiones definitivas debido al limitado tamaño de la muestra y a las consideraciones metodológicas ya comentada. Pese a ello, y de confirmarse en una muestra mayor y con los cambios oportunos, la DCS podría ser una herramienta preventiva para los déficits asociados a la disminución de la neurogénesis en el envejecimiento.

Por lo tanto, sería conveniente seguir con la investigación y estudiar si esta disminución correlaciona positivamente con la ejecución de las tareas de aprendizaje y si la DCS puede potenciar la memoria a través de mecanismos diferentes a la neurogénesis hipocampal. Además, futuras investigaciones deberían determinar si lo que se reduce con la edad es la proliferación y/o supervivencia de neuronas y/o de células gliales en el HPC. Esta nueva línea de investigación supondría un campo muy prometedor dado que el Alzheimer es una enfermedad cada vez más prevalente en nuestra sociedad y son pocos los tratamientos que actúan para frenar el deterioro cognitivo. Sería interesante continuar con este estudio ya que la DCS podría ser una buena herramienta para la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. También sería útil en el ámbito sanitario y clínico porque ayudaría en el tratamiento para pacientes de edad avanzada con problemas cognitivos como pérdidas de memoria o dificultades de aprendizaje.



Información de contacto

Esther Ayuste y Montse Blasco
Cerdanyola del Vallés 08519, Catalunya



NOTA DE PRENSA

De la investigación de los efectos de la D-cicloserina en la neurogénesis hipocampal en ratas envejecidas y su relación con las funciones cognitivas, de Esther Ayuste y Montse Blasco.

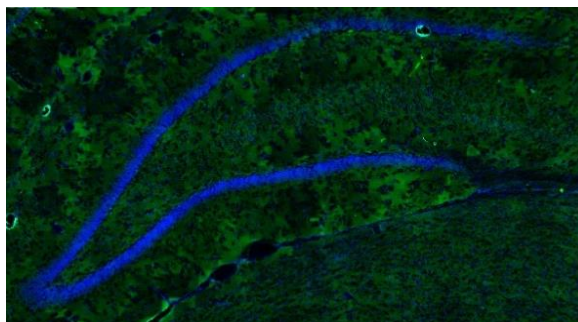
MÁS CERCA DE ENTENDER LAS CLAVES DEL DETERIORO COGNITIVO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

- **Una nueva investigación aporta evidencias a favor de la reducción de la neurogénesis durante el envejecimiento.**

Se estima que el 50% de adultos mayores de 85 años padece Alzheimer y deterioro mental. ¿Pero qué es lo que sucede en el cerebro para que tenga lugar este declive cognitivo? Y lo más importante, ¿podría un fármaco como la D-cicloserina (DCS) ayudar a prevenirlo o reducirlo? Una investigación reciente realizada en la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) ha contribuido de manera relevante a dar respuesta a estas cuestiones.

Se ha demostrado que con la edad se reduce la capacidad de generar nuevas neuronas en una parte del cerebro crítica para los procesos de aprendizaje y memoria, el hipocampo. Esta pérdida de nuevas neuronas se ha relacionado con el declive cognitivo que acompaña al envejecimiento. El estudio “Efectos de la D-cicloserina en la neurogénesis hipocampal en ratas envejecidas y su relación con las funciones cognitivas” fue realizado por las estudiantes de psicología Esther Ayuste y Montse Blasco con el objetivo de evaluar si la administración de DCS podía reducir o frenar la disminución natural de la neurogénesis hipocampal durante el envejecimiento. Para ello, las investigadoras estudiaron en ratas jóvenes y ratas envejecidas los efectos de la inyección de DCS en la neurogénesis hipocampal. La DCS es una sustancia antibiótica utilizada principalmente contra la bacteria de la tuberculosis sin embargo se ha comprobado que también actúa como potenciador cognitivo facilitando la transmisión del neurotransmisor glutamato al activar uno de sus receptores cerebrales, el NMDA. Investigaciones como ésta resultan de vital importancia para hallar las posibles causas que producen el deterioro de las funciones cognitivas, así como los factores que pueden frenarlo durante el envejecimiento, sobretodo en enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Alzheimer.

Se realizó una inmunohistoquímica para BrdU que permitió la detección de nuevas células en el microscopio y posteriormente se fotografió el giro dentado en el microscopio. El análisis estadístico cuantitativo permitió afirmar que en ratas viejas la neurogénesis en el hipocampo es significativamente menor en comparación con las jóvenes. Estos resultados son muy importantes porque confirman las investigaciones previas que han demostrado



Fotografía del GD de una rata joven

una reducción de la neurogénesis hipocampal durante el envejecimiento, relacionada con los problemas mnemónicos y de aprendizaje que se presentan en edades avanzadas.

En este trabajo se intentó comprobar la capacidad de la DCS para potenciar la neurogénesis en ratas envejecidas. Al contrario de lo esperado, no se encontró que la DCS sea una sustancia que contribuya al aumento de la neurogénesis, poniendo en duda su eficacia.

Concluyendo, los resultados obtenidos por la investigación de la UAB aportan nuevas evidencias sobre los cambios que se producen en el cerebro durante el envejecimiento. Además, en la actualidad son pocas las investigaciones que han considerado la DCS como potenciador y es importante la difusión de este estudio para nuevas líneas de investigación.

Nota de prensa 2

Un estudio de la neurogénesis amplía horizontes en la investigación contra el deterioro cognitivo en el envejecimiento

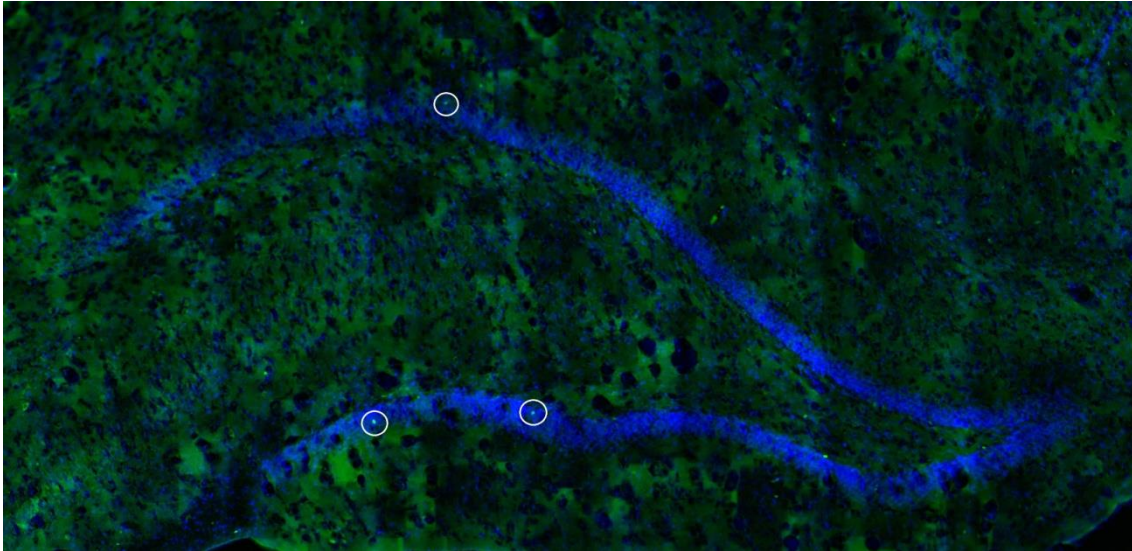
Los avances en medicina del último siglo han supuesto un gran aumento de la esperanza de vida en nuestro país. No obstante, esto no ha garantizado la calidad de vida de los ancianos que ven deteriorarse sus capacidades cognitivas con el paso de los años. Las neurociencias y su estudio del envejecimiento del cerebro se ha vuelto un tema de gran relevancia en los últimos años.

La neurogénesis es el proceso de creación de nuevas células en el sistema nervioso central que se da en todos los mamíferos durante el desarrollo cerebral del feto pero también durante toda la vida en ciertas regiones del cerebro como es el caso del giro dentado del hipocampo. Esta área del cerebro está vinculada a los procesos de aprendizaje y memoria, función cognitiva que declina con la edad.

Dos investigadoras del Departamento de Psicobiología y de Metodología de las Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Barcelona han llevado a cabo un estudio que demuestra que las ratas envejecidas tienen mucha menos neurogénesis en el giro dentado del hipocampo que las jóvenes. Esta disminución en la creación de nuevas células podría estar relacionada con la pérdida de funciones cognitivas. Por otro lado, se estudió si la administración de un fármaco, la D-cicloserina, en el hipocampo de las ratas podría tener un efecto potenciador en la neurogénesis en el hipocampo. Este fármaco es un antibiótico con propiedades para potenciar el aprendizaje y la memoria en personas y se ha comprobado que su administración en ratas envejecidas mejora el rendimiento de la memoria espacial.

El estudio consintió en la inyección del fármaco a la mitad de un grupo de ratas jóvenes y a la mitad de un grupo de ratas envejecidas antes de dos tareas de aprendizaje espacial. Post mortem, se realizó un análisis del giro dentado de las ratas que, mediante un proceso de inmunohistoquímica y fotografía microscópica, permitió marcar y cuantificar el número de nuevas células generadas. Los resultados mostraron que las ratas envejecidas presentaban una tasa mucho menor de neurogénesis en el giro dentado que las jóvenes,

confirmando así que la edad conlleva un descenso de la creación de nuevas células en el cerebro. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas entre el número de células nuevas de las ratas viejas con D-cicloserina y las viejas sin el fármaco.



Estos resultados permiten abrir nuevas puertas para la investigación de nuevos tratamientos capaces de reducir o frenar el deterioro cognitivo que aparece con el envejecimiento actuando en mecanismos neurofisiológicos naturales como es la proliferación y supervivencia de nuevas células en el cerebro. Asimismo estas investigaciones contribuyen a un mejor conocimiento de los procesos del envejecimiento y ciertas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, temas que van adquiriendo relevancia en una población cada vez más anciana.